Studien zur perkutanen Permeation von Blutegelwirkstoffen (Hirudin und Eglin) an der isolierten Schweinehaut

Charlotte Gasteiger

Diss
München
1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544313_0025

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische
Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der
Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Hans Fritz

Studien zur perkutanen Permeation von Blutegelwirkstoffen (Hirudin und Eglin) an der isolierten Schweinehaut

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Charlotte Gasteiger aus Haimhausen
- 1984 -

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Fritz
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.1984

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Fritz in der Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München in der Zeit von Dezember 1980 bis Dezember 1982 durchgeführt.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Abteilung, die mich bei meiner Arbeit bereitwillig unterstützten.

Für die Einweisung in die praktische Arbeit mit Proteaseinhibitoren danke ich Frau Maria Meier und Dr. Angela Stölzle.

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Frau Dr. Ursula Seemüller, die mich während der gesamten Dauer der Arbeit betreute. Sie fand stets Zeit für mich, um anfallende Probleme zu diskutieren und mich zu neuen Experimenten zu ermuntern. Ihre positive Einstellung trug erheblich für das Gelingen der vorliegenden Arbeit bei. Sie stellte mir reines Eglin b zur Verfügung.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Fritz danke ich für die Überlassung des Themas und besonders für die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Wind für die Anfertigung der Abbildungen bedanken.

INHALTSVERZEICHNIS

A. EINLEITUNG S. 1

1. Die Anatomie der Haut S. 2

2. Grundlagen der perkutanen Resorption S. 5

2. 1. Diskutierte Definitionen S. 5

2. 2. Transepidermale und transfollikuläre Resorption S. 6

3. Beeinflussung der perkutanen Resorption S. 9

3. 1. Zustand der Haut S. 9

3. 2. Trägersubstanzen in der Salbe S. 11

3. 3. Wirkstoffkonzentration S. 13

3. 4. pH-Wert S. 13

3. 5. Temperatur S. 14

3. 6. Löslichkeit und Molekulargwicht des Wirkstoffes S. 14

3. 7. Anwendungsart der Pharmaka S. 15

4. Die Blutegelwirkstoffe S. 15

4. 1. Hirudin S. 15

4. 2. Eglin S. 19

4. 3. Bdelline S. 21

5. Aufgabenstellung S. 21

B. MATERIAL UND METHODEN S. 22

1. Substanzen S. 22

2. Proteinbestimmung nach der Methode von Folin-Ciocalteu S. 23

3. Enzymaktivitäts- und Hemmaktivitätsbestimmungen S. 24

3. 1. Thrombin-Test S. 24

3. 2. Chymotrypsin-Test S. 25

3. 2. 1. Substrat: Suc-L-Phe-pNA S. 25

3. 2. 2. Substrat: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA S. 25

4. Resorptionsmodelle S. 26

4. 1. Resorptionsmodell für Lösungen S. 26

4. 2. Salbenliberationszelle S. 28

5. Membran S. 28

6. Resorptionsversuche S. 30

6. 1. Resorption von Hirudin und Eglin aus Lösungen S. 30

6. 1. 1. Resorption aus Rohextraktlösungen S. 32
6. 1. 1. 1. Zeitabhängigkeit S. 32
6. 1. 1. 2. Konzentrationsabhängigkeit S. 32
6. 1. 1. 3. Temperaturabhängigkeit S. 33

6. 1. 1. 4. Abhängigkeit der Resorption von Zusatzstoffen S. 33

6. 1. 2. Resorption aus Reinsubstanzlösungen S. 33

6. 1. 2. 1. Hirudin S. 34
6. 1. 2. 2. Eglin S. 34

6. 2. Resorption von Hirudin und Eglin aus Zubereitungen S. 35

6. 2. 1. Gel S. 35

6. 2. 2. Salbe S. 35

C. ERGEBNISSE S. 36

1. Kontrollversuche S. 37

2. Resorption von Hirudin und Eglin aus Lösungen S. 38

2. 1. Resorption aus Rohextraktlösungen S. 38

2. 1. 1. Zeitabhängigkeit S. 38

2. 1. 2. Konzentrationsabhängigkeit S. 43

2. 1. 3. Temperaturabhängigkeit S. 52

2. 1. 4. Abhängigkeit von Zusatzstoffen S. 56

2. 2. Resorption aus Reinsubstanzlösungen S. 65

3. Resorption von Hirudin und Eglin aus Zubereitungen S. 70

3. 1. Gel S. 70

3. 2. Salbe S. 73

D. DISKUSSION S. 77

1. In-vitro-Resorptionsmodelle S. 77

2. Resorption von Hirudin und Eglin aus Rohextraktlösungen S. 79

3. Resorption von Hirudin und Eglin aus Reinsubstanzlösungen S. 81

4. Resorption von Hirudin und Eglin in Gegenwart von Zusätzen S. 83

4. 1. Hyaluronidase S. 83

4. 2. Kallikrein und Kinine S. 84

5. Resorption von Hirudin und Eglin aus Zubereitungen S. 86

E. ZUSAMMENFASSUNG S. 88

F. ANHANG S. 90

WICHTIGE UMRECHNUNGSFAKTOREN S. 90

LITERATURVERZEICHNIS S. 91

LEBENSLAUF S. 108

Verzeichnis der Abkürzungen

ATE	Antithrombin-Einheiten
DIC	Disseminated intravasal coagulation
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI	Enzym-Inhibitor-Komplex
HA	Hemmaktivität
HPR	Hautpermeationsrate
IU bzw. mIU	Inhibitor-Unit bzw. milli-Inhibitor Unit
PHB-Ester	p-Hydroxy-benzoesäure-methylester
SHPR	Standardhautpermeationsrate
Suc	Succinyl
TRA	Triäthanolamin
TRIS	Tris-hydroxy-methyl-aminomethan
U bzw. mU	Unit bzw. milli-Unit

Aminosäuren

Ala - Alanin
Arg - Arginin
Asn - Asparagin
Asp - Asparaginsäure
Cys - Cystein
Gln - Glutamin
Gly - Glycin
His - Histidin
Ile - Isoleucin
Leu - Leucin
Lys - Lysin
Phe - Phenylalanin
Pro - Prolin
Ser - Serin
Thr - Threonin
Tyr - Tyrosin
Val - Valin

A. EINLEITUNG

Die Anwendung der verschiedensten Präparate auf der Haut ist genauso alt wie die Geschichte der Medizin. Unter den Arzneimitteln des Königs Assurbanipal von Ninive (7. Jhrhdt.v.Chr.) wird erstmals die Arzneiform Salbe beschrieben, die als Einreibung oder als Umschlag verabreicht wird. Zubereitet wird sie von priesterlichen Ärzten oder im Haushalt. Die Salbe als kosmetisches Mittel wird dagegen schon gewerblich hergestellt (12).
Die ägyptische Medizin und Pharmazie hatte nachhaltigen Einfluß auf die frühe Heilkunde der Griechen. Wichtige Schriften für die Geschichte der Medizin sind die homerischen Dichtungen Ilias und Odyssee (wohl 9./8. Jhrhdt.v.Chr.). Die Beschreibungen von Arzneimitteln erfolgte bei Homer zwar spärlich, doch werden u.a. auch die Anwendung von Salben und Ölen für die Wundheilung erwähnt (12).

Die römische Heilkunde ist eine Fortentwicklung der griechischen. Die Herstellung und der Vertrieb von Salben war bei den Römern Aufgabe der "unguentarii" (49). Zum großen Reformator der Medizin wurde Galenus, geb. 129 n.Chr. in Pergamon. Galen fordert die Selbstherstellung der Arzneien durch den Arzt und setzt dazu umfassende Warenkenntnisse und genaue Untersuchung der Rohstoffe voraus (12).
Heutzutage steht dem Kliniker eine beachtliche Anzahl verschiedener dermatologischer Zubereitungen zur Verfügung. Um diese sinnvoll einsetzen zu können, sollte er nicht nur über die Zusammensetzung der Präparate und die Wirkungsweise der Pharmaka informiert sein, sondern auch Kenntnisse über den Aufbau der Haut und die Grundlagen der perkutanen Resorption besitzen. Nur wenn man die perkutane Penetrationsfähigkeit eines Prä-

parates kennt, läßt sich auf lokale und systemische Wirkungen und Nebenwirkungen schliessen.

A. 1. Die Anatomie der Haut (Abb. 1 und 1a)

Die Haut des Erwachsenen ist ein ca. 1,6 m^2großes Organ, das wichtige Aufgaben erfüllt und zwar:
- Schutz vor mechanischen, chemischen und thermischen Schäden
- Regulation der Wärme- und Flüssigkeitsabgabe
- Schutz vor dem Eindringen von Krankheitserregern (50).

Die Haut umfaßt die Schichten der Epidermis, des Coriums (Lederhaut) und des Subkutanfettgewebes.
Dabei läßt sich die Epidermis untergliedern in (von innen nach aussen):
- Stratum basale (Grenze zwischen Epidermis und Corium)
- Stratum spinosum
- Stratum granulosum und lucidum (hier setzt die Verhornung ein, wobei das Stratum lucidum bisher nur im Palmoplantarbereich nachgewiesen wurde)
- Stratum corneum, die eigentliche Hornschicht (50).

Die Hornschicht besteht im wesentlichen aus Keratin, einem Sulfhydrylgruppen enthaltenden Protein, das nach entsprechender Quellungszeit große Mengen von Wasser ($1 \mu l \cdot h^{-1} \cdot cm^{-2}$) und polaren Substanzen aufzunehmen vermag (3). Dies erklärt die Reservoirfunktion der Hornschicht im feuchten Zustand (120); sie ist in der Lage, lokal applizierte Substanzen gemäß ihrer morphologischen Struktur zu speichern und dadurch zurückzuhalten (83).

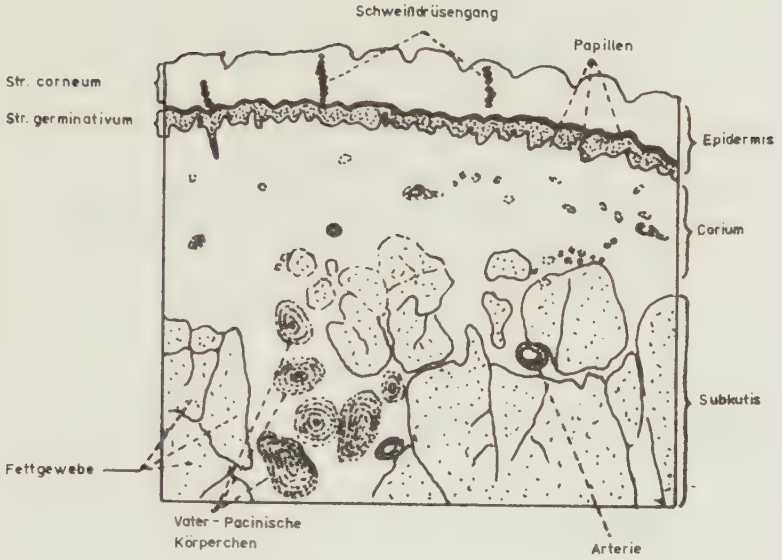

Abb. 1: Die Schichtengliederung der Haut (96)

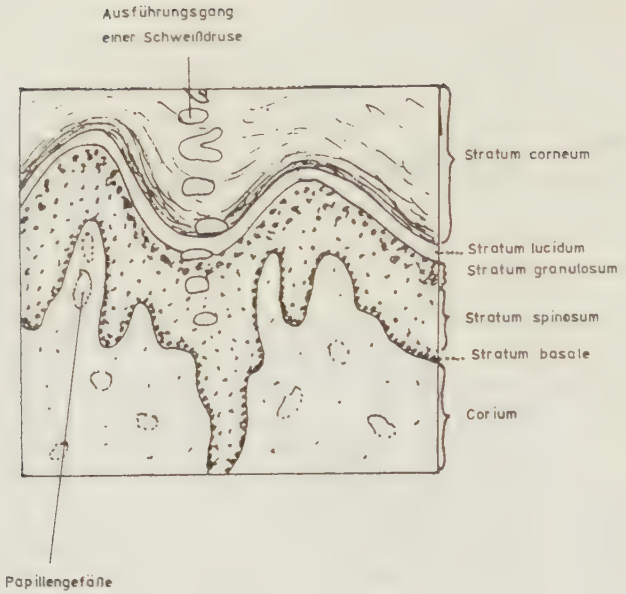

Abb. 1a: Die verschiedenen Schichten der Epidermis (96)

Die Dicke des Stratum corneum variiert je nach Körperregion zwischen 8 µm und 13 µm (87), im Palmoplantarbereich beträgt sie ca. 300 µm.

A. 2. Grundlagen der perkutanen Resorption

A. 2. 1. Diskutierte Definitionen

Da der Begriff der "perkutanen Resorption" eine wesentliche Bedeutung für die vorliegende Studie besitzt, soll er etwas näher erläutert werden.
S. Rothman definiert die perkutane Resorption als die Penetration von Substanzen von der Hautaussenseite in die Haut und schließlich durch die Haut hindurch bis in den Blutkreislauf (80). Ein anderer Autor bezeichnet diesen Vorgang auch als Permeation (103). Die detaillierteste Definition liefert Schaefer, der den gesamten Prozeß der Resorption in 3 Stufen unterteilt (83):

- Penetration ist der Eintritt einer Substanz in eine bestimmte Zellschicht oder in ein Organ.
- Permeation ist die Penetration durch eine Zellschicht in eine andere Schicht, die sich sowohl funktionell als auch strukturell von der ersten unterscheidet.
- Resorption ist die Aufnahme einer Substanz in das Gefäßsystem.

Andere Autoren wie z.B. Blank vertreten den Standpunkt, daß die genaue Definition des Begriffes der "perkutanen Resorption" nicht notwendig sei (6). Viel wichtiger sei es dagegen, Kenntnisse darüber zu erhalten, wie bestimmte Moleküle in und durch die Haut gelangen.
Dafür bieten sich zwei unterschiedliche Möglichkeiten an,

ein
- transepidermaler und ein
- transfollikulärer Resorptionsweg.

A. 2. 2. Transepidermale und transfollikuläre Resorption (Abb. 2)

Transepidermale Resorption

Unter der transepidermalen Resorption versteht man die Aufnahme einer Substanz über die Haut, d.h. Durchdringung der Hautschichten (s.o.) bis ins Subcutisgewebe. Dabei kommt der Hornschicht die wesentliche Aufgabe einer sog. Barriere zu (19, 20, 81).
Diese Barriere, erstmals von Rein als Grenzschicht zwischen Stratum corneum und Stratum granulosum beschrieben, weist eine elektronegative Ladung auf (77), solange der pH-Wert höher als 3 - 3,5 ist. 30 Jahre später einigten sich verschiedene Autoren darauf, den Übergangsbereich zwischen verhornter und unverhornter Epidermis als Grenzschicht im Sinne einer Barriere zu definieren (9, 55). Wenig danach wurde die epidermale Barriere als eine Schicht von 2 bis 3 Zellagen mit einer Dicke von 10 µm anatomisch exakter beschrieben (107). Diese Angaben wurden jedoch von vielen Autoren angezweifelt, die die Ansicht vertraten, daß alle Lagen der Hornschicht an der Barriere beteiligt sind (7, 46, 84, 111, 109). Dafür spricht u.a., daß jede Hälfte für sich eine wirksame Barriere darstellt, wenn man das Stratum corneum horizontal in 2 Hälften trennt (87). Bis heute ist die Frage noch nicht endgültig geklärt, auf welche strukturellen Elemente die Barriere letztlich zurückzuführen ist und worauf ihre Wirkung im Detail beruht. Mit Sicherheit steht nur fest, daß die Barrierefunktion mit dem Vorhandensein einer intakten Hornschicht verbunden ist.

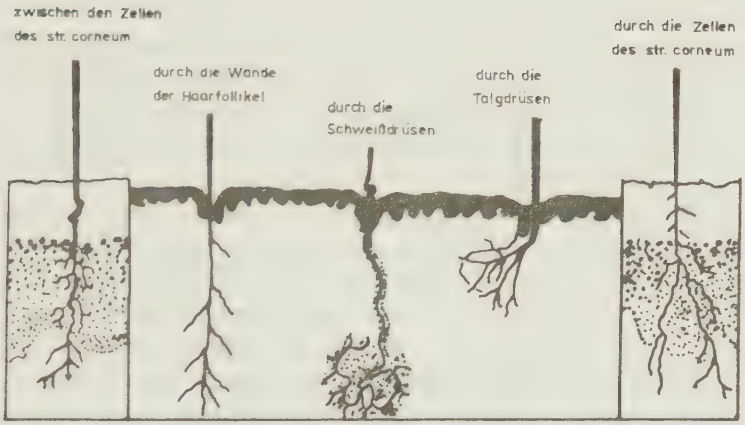

Abb. 2: Penetrationsmöglichkeiten
in und durch die Haut (3)

Außer den Zellschichten der Haut ist auch der Interzellularraum des Stratum corneum für die perkutane Resorption von Bedeutung. Ihm kommt jedoch, im Vergleich zum zellulären Teil, eine geringere räumliche Ausdehnung zu. Der Interzellularraum ist angefüllt mit polaren Lipiden, die eine vom intrazellulären Keratin unterschiedliche Permeabilität aufweisen. Der Interzellularraum im Stratum corneum bietet somit eine Umgehungsmöglichkeit der keratinischen Zellstruktur (87).

Transfollikuläre Resorption

Eine erleichterte Durchdringung der Haut unter Umgehung des Stratum corneum kann u.U. über die Haarfollikel sowie die Talg- und Schweißdrüsen erfolgen. In den Haarfollikeln ist die Zahl der Epithelzellen im Vergleich zur Hautoberfläche stark vermindert, ihre Basis besteht sogar nur aus einer einzigen Schicht nicht keratinisierter Zellen. Die Membran der Schweißdrüsen ist ebenfalls permeabler als die des Stratum corneum (84). Während Haarfollikel und Talgdrüsen als Umgehungsmöglichkeit des Stratum corneum anerkannt sind, bestehen allerdings Kontroversen darüber, ob dies auch für die Schweißdrüsen zutrifft. Die Mehrzahl der Autoren verneint diese Möglichkeit, nicht zuletzt wegen der geringen Resorptionskapazität von Fußsohlen und Handinnenflächen (21, 39, 53, 92).

Der Einfluß der Hautanhangsgebilde (Haarfollikel, Talg- und Schweißdrüsen) auf die Hautpermeabilität dürfte jedoch in den meisten Fällen gering sein, da sie nur eine Fläche von 0,1% der gesamten Oberfläche darstellen (82, 108).

Für die Substanzen, die das Stratum corneum nur sehr langsam durchdringen, kann die Diffusion über diese Shunts jedoch bedeutend werden (7). Die Diffusion über diese Nebenwege erscheint dabei besonders für sehr polare Moleküle wichtig zu sein (85).

Die Permeabilität des intakten Stratum corneum für Elektrolyte ist so extrem niedrig, daß eine Penetration nur über die Hautanhangsgebilde möglich ist (109).

Somit stellt sich die Frage nach dem Weg für die Resorption.
Scheuplein ist der Auffassung, daß unter entsprechenden Bedingungen jede der angesprochenen Permeationsmöglichkeiten (Stratum corneum, Haarfollikel, Talgdrüsen) dominieren kann (85). Vor allem zu Beginn der Diffusion (Transientstadium) wird die Aufnahme primär über die Haarfollikel und Talgdrüsen erfolgen, im anschliessenden Gleichgewichtsstadium überwiegt dann die Diffusion über das intakte Stratum corneum. Das Erreichen eines "steady state" resultiert aus einem konstanten Beitrag der transepidermalen und transfollikulären Resorption. Das Stadium des steady state ist von den chemischen Eigenheiten der eindringenden Substanz abhängig (103).

A. 3. Beeinflussung der perkutanen Resorption

A. 3. 1. Zustand der Haut

Ist die Hornschicht durch ein Trauma der Haut wie Schnitte, Risse, Sonnenbrand oder ein Ekzem zerstört, so gelangen Substanzen leichter in die Dermis. Bei Hyperkeratosen wie der Ichthyosis vulgaris verursacht die verzögerte Abstoßung der Hornschicht einen erhöhten Wasserverlust (29); der Zusammenhalt zwischen den einzelnen Hornzellen ist gestört (die desmosomalen Disken sind nicht mehr intakt), so daß die Zellen sich all-

mählich voneinander ablösen. Bei Parakeratosen (z.B. Psoriasis vulgaris) findet sich eine Auflockerung der Interzellularbrücken, wodurch in der Hornschicht regelrechte Höhlen entstehen, in die exogen zugeführte Substanzen ohne weiteres eindringen können (70).
Bei einer Dermatitis solaris ist die Permeabilität gegenüber organischen Substanzen auf das 10-fache erhöht (102, 104). Bei Hautentzündungen jeder Art kann sich die Penetration in einem solchen Maße verstärken, daß Substanzen, die von gesunder Haut ohne weiteres toleriert werden, lokal oder systemisch toxische Effekte hervorrufen können (82).

Die perkutane Resorption wird auch durch die Vorbehandlung der Haut beeinflußt. Jäcker untersuchte den Einfluß chemischer und mechanischer Enthaarung auf die perkutane Resorption (42). In allen Versuchen zeigten sich beachtliche Unterschiede zwischen enthaarten und nicht enthaarten Tieren. Den größten Schaden trug die Barriere beim Rasieren ohne vorheriges Einseifen davon. Die Resorptionsraten steigen entsprechend der Vorbehandlung in folgender Reihenfolge an: nicht enthaart < Rasieren mit vorherigem Einseifen < Enthaarungscreme-Behandlung < Rasieren ohne Einseifen.
Des weiteren ist die Resorption von Alter und Dicke der Haut abhängig. Je dicker und starrer die Haut ist, umso geringer ist die Resorptionsrate (83). Experimentelle Daten zeigen, daß die perkutane Resorption bei alten Menschen signifikant vermindert ist (41). Dagegen findet sich bei Kindern vor allem in der Perinatalzeit eine erhöhte Penetrationsrate (83, 109).

A. 3. 2. Trägersubstanzen in der Salbe

Geeignete Trägersubstanzen zeichnen sich dadurch aus, daß sie sich leicht auf der Hautoberfläche verteilen und gut mit dem Talg der Haut mischen, wodurch sie das aufzunehmende Material mit den Hornzellen in Kontakt bringen (3, 71). Die Trägersubstanzen können nicht die Resorption nicht resorbierbarer Substanzen bewirken, sie können jedoch die Resorptionsrate und Resorptionsgeschwindigkeit für resorbierbare Substanzen erhöhen (8). Die Freisetzung eines Wirkstoffes aus der Trägersubstanz ist abhängig von folgenden Parametern:
- der Fähigkeit zur Kodiffusion mit der Trägersubstanz (Vehikelphänomen)
- der Konzentration in der Trägersubstanz
- dem Verteilungskoeffizienten zwischen Trägersubstanz und aufnehmendem Medium (83).

Beispiele für Trägersubstanzen

Wasser

Die Durchfeuchtung der Haut ist einer der bedeutendsten Faktoren für die Penetration der Haut durch Pharmaka (94). Das Stratum corneum kann bis zum 4-fachen seines eigenen Gewichts an Wasser aufnehmen. Wasser lockert durch Quellung die kompakte Struktur des Stratum corneum auf (7). Die Resorptionsrate durch die Haut kann dadurch auf das 4- bis über 10-fache ansteigen (7, 17, 22, 33, 48, 86, 92, 93). Die Verwendung von Okklusivverbänden zur besseren Resorption lokal applizierter Pharmaka stellt eine praktische Anwendung dieser Erkenntnis dar (22, 64, 65). Zudem bewirkt der Okklusivverband eine größere Austauschfläche (36).

Organische Lösungsmittel

Äther, Chloroform, Benzin und Azeton durchdringen die

Haut sehr leicht und erhöhen die perkutane Resorption in solchem Ausmaße, daß u.U. toxische Effekte auftreten können (68, 112).
Die Anwendung organischer Lösungsmittel führt zu wesentlichen Veränderungen des Widerstandes der Hautbarriere und damit zur Beeinflussung der Diffusionskonstanten der permeierenden Substanz (40, 73).
50%- und 90%-iges DMSO wird genauso rasch durch die Haut resorbiert und vom Körper metabolisiert wie Wasser (99, 115, 119). Diese hohe Resorptionsrate erklärt sich durch die polare Struktur dieses organischen Lösungsmittels, das sowohl mit Wasser als auch mit den meisten lipophilen Lösungsmitteln unbegrenzt mischbar ist. Dies bedeutet aber auch, daß DMSO eine Desintegration von Lipiden etc. auslöst und folglich Membranstrukturen zerstören kann. Solche Desintegrationsprozesse betreffen vor allem die Hornschicht, die während der lokalen Applikation von DMSO den höchsten Konzentrationen ausgesetzt ist (1, 87, 95). Zwar erhöht sich die Resorptionsrate verschiedenster Substanzen beträchtlich, wenn sie im Gemisch von DMSO angeboten werden, jedoch werden dadurch evtl. Hautschäden produziert (54, 67, 99).

Oberflächenaktive Agenzien (Surfactants)

Zu dieser Gruppe gehören Detergenzien, Seifen und Lösungsmittel. Ihre resorptionsvermittelnde Wirkung beruht auf der Herabsetzung der Oberflächenspannung. Regelmäßiger Kontakt der Haut mit Geschirrspülmitteln führt zu erheblichen Gewebsschäden, wodurch sich die perkutane Resorption schädlicher Substanzen beträchtlich erhöht (87). Eine Arbeitsgruppe in Mainz konnte kürzlich im Tierexperiment zeigen, daß sich die Wahrscheinlichkeit, an Magenkrebs zu erkranken, durch Spülmittelrückstände auf dem Geschirr erhöht; erklärt wird diese Beobachtung durch eine Permeabilitätsstei-

gerung der Magenschleimhaut für viele Substanzen, die durch die Tenside verursacht wird (15).

A. 3. 3. Wirkstoffkonzentration

Die perkutane Permeation ist normalerweise abhängig von der Wirkstoffkonzentration, bis die Sättigungskonzentration in der Hornschicht erreicht ist; der genaue Einfluß der Wirkstoffkonzentration ist aber noch nicht endgültig geklärt. Z.B. führt die Erhöhung der Sulfonamidkonzentration in einer Lösung um das 10-fache nicht zur Erhöhung der Resorptionsrate (100). Ähnliche Ergebnisse erbrachten Untersuchungen mit Quecksilber ($HgCl_2$) (48). Ein Grund dafür könnte sein, daß mit diesen Substanzen schon in sehr niedrigen Konzentrationen eine Sättigung der Hornschicht erreicht wird (80).

A. 3. 4. pH-Wert

Die Resorption saurer und basischer Substanzen wird vom pH-Wert der Trägersubstanz stark beeinflußt. So wird z.B. die Resorptionsrate von Histamin um das 10-fache erhöht, wenn der pH-Wert einer Lösung von 7,5 auf 5,5 herabgesetzt wird (40).
Bei systemischer Alkalose ist die perkutane Resorption verschiedener Pharmaka erhöht, während systemische Azidose eine Abnahme der perkutanen Resorption zur Folge hat (46).
pH-Bereiche unter 3,7 bis 4,5 sollten vermieden werden, da hier der isoelektrische Punkt des Keratins liegt. Bei einem pH über 11 kommt es zu irreversiblen Schäden des

Stratum corneum, wodurch die Permeabilität extrem gesteigert wird (82).

A. 3. 5. Temperatur

Eine Erhöhung der Hauttemperatur führt zu verstärkter perkutaner Resorption (25). Dies ist auf eine Verminderung der Viskosität des Hauttalgs und eine verstärkte Hautdurchblutung durch Vasodilatation der Hautgefäße zurückzuführen. Die Resorptionsrate von Sarin (Isopropylester der Methylfluorphosphorsäure) steigt z.B. auf ungefähr das Doppelte an, wenn die Temperatur um 10°C erhöht wird (5, 24).

A. 3. 6. Löslichkeit und Molekulargewicht des Wirkstoffes

Ein wesentlicher Faktor für die Hautgängigkeit ist die Lipoidlöslichkeit eines Medikamentes (80). Eine maximale perkutane Resorption erreicht man, wenn die Wirksubstanz gute Lipoidlöslichkeit mit geringer Wasserlöslichkeit vereinigt. Solche Substanzen lösen sich im Talg der Haut, penetrieren rasch und verteilen sich dann in der Gewebeflüssigkeit. Die Insektizide der Organophosphat-Gruppe (potente Enzyminhibitoren) sind in dieser Hinsicht ein besonders eklatantes, den Organismus gefährdendes Beispiel. Ihre Resorption ist durch künstliche Barrieren kaum zu verhindern (34).
Von großem Einfluß auf die perkutane Resorptionsrate ist auch das Molekulargewicht eines Pharmakons; je grösser dieses ist, desto geringer ist normalerweise die Permeationsrate.

A. 3. 7. Anwendungsart der Pharmaka

Die Anwendungsart der Pharmaka ist von entscheidender Bedeutung für die perkutane Resorption.

- Reiben und Massieren der Haut verursachen eine lokale Vasodilatation der Hautgefäße, sowie einen Anstieg der Hauttemperatur und damit eine Steigerung der perkutanen Resorption (83).
- Mechanischer Druck auf die Haut drängt das Medikament in die Haarfollikel und vermischt es mit dem Hauttalg. Dadurch wird die Resorptionsrate auch höhermolekularer Substanzen erhöht (80, 103).

A. 4. Die Blutegelwirkstoffe

A. 4. 1. Hirudin (Abb. 3)

Hirudin, der am längsten bekannte Wirkstoff des Blutegels, wurde vor 100 Jahren von Haycraft entdeckt und für Blutgerinnungsversuche verwendet (38). Erst 70 Jahre später isolierte Markwardt diesen Wirkstoff als Reinsubstanz, charakterisierte ihn eingehend und klärte den Reaktionsmechanismus mit seinem natürlichen Antagonisten Thrombin auf (57, 61).
Hirudin ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 7043, das aus 65 Aminosäuren zusammengesetzt ist (112). Das Molekül zeichnet sich durch einen hohen Anteil an Aminodicarbonsäuren und einen sulfatierten Tyrosinrest (in Position 63 der Sequenz) aus.
Die Primärstruktur des Hirudins wurde von Magnusson et al. weitgehend (72) und Dodt et al. (16) vollständig

```
1                                       10
Val-Val-Tyr-Thr-Asp-Cys-Thr-Glu-Ser-Gly-Gln-Asn-Leu-Cys-

15                  20
Leu-Cys-Glu-Gly-Ser-Asn-Val-Cys-Gly-Gln-Gly-Asn-Lys-Cys-

29                                                  40
Ile-Leu-Gly-Ser-Asp-Gly-Glu-Lys-Asn-Gln-Cys-Val-Thr-Gly-

43                              50
Glu-Gly-Thr-Pro-Lys-Pro-Gln-Ser-His-Asn-Asp-Gly-Asp-Phe-

57          60          SO3-
Glu-Glu-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Leu-Gln
```

Abb. 3: Aminosäuresequenz des Hirudin

aufgeklärt.
Hirudin hemmt spezifisch das Gerinnungsenzym Thrombin. Die Hemmaktivität wird in Antithrombineinheiten (ATE) mit Fibrinogen als Substrat gemessen oder in Inhibitor-Units (IU) angegeben, wenn sie mit synthetischen Peptidsubstraten bestimmt wurde (60). Hirudin bildet mit Thrombin einen äquimolaren Enzym-Inhibitor-Komplex, in dem alle katalytischen Funktionen des Thrombins blockiert sind (60). Die Reaktion zwischen Thrombin und Hirudin verläuft rascher als die Spaltung des Fibrinogens durch Thrombin (61). Bei der Reaktion mit Hirudin verliert das Thrombin nicht nur seine spezifische proteolytische Wirkung auf das Fibrinogen, sondern auch seine Wirkung auf andere Faktoren der Gerinnungskaskade und auf die Thrombozyten (Abb. 4). Auch die Bildung bestimmter Thrombinformen durch Autokatalyse wird blockiert (62). Umstritten ist noch, ob auch der Faktor IXa durch Hirudin gehemmt wird (116). Der Hirudin-Thrombin-Komplex zeichnet sich durch eine sehr geringe Dissoziationskonstante aus; sie wird mit K_i = 82 pmol/l angegeben (59).

Aufgrund seiner spezifischen Hemmaktivität gegenüber Thrombin eignet sich Hirudin zur Therapie der Hyperkoagulopathie, bzw. bei Thromboseneigung. Experimentell erzeugte Gerinnungsthromben werden durch prophylaktische Hirudingabe verhindert (63).
In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß eine vorherige Verabreichung von Hirudin vor der letalen Wirkung einer Thrombininjektion schützt (58).
Hirudin ist ferner in der Lage, die Bildung von Mikrothromben bei der DIC und beim Sanarelli-Shwartzman-Phänomen wirksam zu verhindern (37).

Hirudinhaltige Salben und Gele finden Verwendung zur Beschleunigung der Resorption von Hämatomen, insbesondere nach Gelenkoperationen und bei Sportverletzungen wie Distorsionen, bei Kontusionen sowie in der Behandlung von ober-

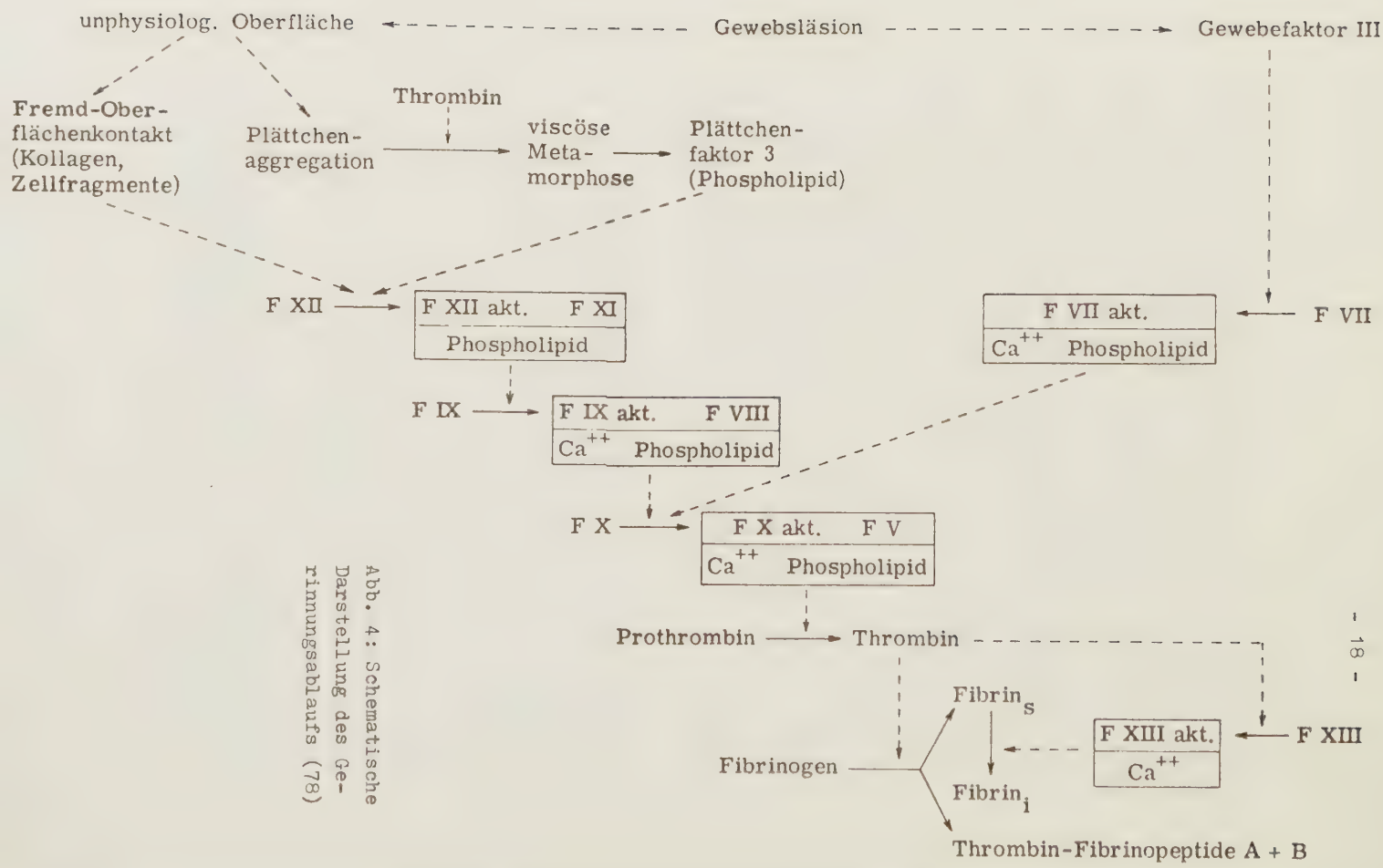

Abb. 4: Schematische Darstellung des Gerinnungsablaufs (78)

flächlichen Thrombophlebitiden und der Akne vulgaris, des Status varicosus und von Erfrierungen (14, 32, 79, 89, 98, 117, 121). Die systemische Applikation von Hirudin zur Antikoagulation bei Hämodialysen wird derzeit ebenfalls diskutiert (vgl. G. Haas, Über Blutwaschung, Klinische Wochenschrift 7, 1928, S. 1356 - 1362).

A. 4. 2. Eglin (Abb. 5)

Eine andere Gruppe von Inhibitoren aus dem Blutegel stellen die Egline dar.
Die Egline sind Polypeptide mit Molekulargewichten von 8073 bzw. 8099, die aus 70 Aminosäuren bestehen. Das Fehlen von struktur-stabilisierenden Disulfidbrücken ist ein besonderes Charakteristikum der Egline; sie gehören somit zu den sog. "Cystine-independant" Protein-Proteinase-Inhibitoren (90). Die Aminosäuren Methionin und Isoleucin sind ebenfalls nicht im Molekülverband vorhanden.
Die Aufklärung der Primärstruktur von Eglin c gelang Seemüller et al. 1979 (91).
Die Egline hemmen Chymotrypsin, Subtilisin und die lysosomalen Granulozytenproteasen Elastase und Kathepsin G (90).

Die Hemmaktivität der Egline gegenüber den intrazellulären Proteasen Elastase und Kathepsin G ist deswegen von besonderem Interesse, da diese Enzyme ein großes proteolytisches Potential zum intrazellulären Proteinkatabolismus beisteuern (31, 43, 113). Im Verlauf akuter entzündlicher Vorgänge, wie der Sepsis oder nach Polytrauma, können diese physiologischerweise intrazellulär wirkenden proteolytischen Enzyme durch erhöhte Freisetzung bzw. vermehrten Zellzerfall extrazellulär wirksam werden. Somit können Kathepsin G und Elasta-

```
                                                    10
NH2-Thr-Glu-Phe-Gly-Ser-Glu-Leu-Lys-Ser-Phe-Pro-Glu-Val-

14                          20
Val-Gly-Lys-Thr-Val-Asn-Gln-Ala-Arg-Glu-Tyr-Phe-Thr-Leu-

28      30                                              40
His-Tyr-Pro-Gln-Tyr-Asn-Val-Tyr-Phe-Leu-Pro-Glu-Gly-Ser-

42                                  50
Pro-Val-Thr-Leu-Asp-Leu-Arg-Tyr-Asn-Arg-Val-Arg-Val-Phe-

56              60
Tyr-Asn-Pro-Gly-Thr-Asn-Val-Val-Asn-His-Val-Pro-His-Val-

70
Gly-COOH
```

Abb. 5: Aminosäuresequenz des Eglin c

```
                                                    10
Asn-Ile-Leu-Gly-Arg-Glu-Ala-Lys-Cys-Thr-Asp-Thr-Glu-Cys-

15                      20
Val-Cys-Thr-Lys-Glu-Leu-His-Arg-Val-Cys-Gly-Ser-Asp-Gly-

29
Val-Thr-Tyr-Asp-Asn-Glu-Cys-Leu-Ala-x-x-x-x-x-x-x-x-x-x-

x-x-x-x-x-x-
```

Abb. 6: Teilsequenz von Bdellin B_3 (47)

se als typische Verdauungsenzyme dem eigenen Organismus gefährlich werden, z.B. durch Inaktivierung von Strukturproteinen und humoralen Faktoren (88).
Die Egline sind deshalb von besonderem therapeutischen Interesse im Hinblick darauf, lokales aber auch generalisiertes Entzündungsgeschehen durch Neutralisierung der extrazellulären Verdauungswirksamkeit lysosomaler Proteasen abzuschwächen.
Der schon lange bekannte antiphlogistische Effekt des Blutegels mag u.U. auf diesen proteasehemmenden Effekt der Egline zurückzuführen sein (28).

A. 4. 3. Bdelline (Abb. 6)

Eine dritte Gruppe von Blutegelwirkstoffen sind die Bdelline; das sind Trypsin-Plasmin-Inhibitoren, die von Fritz et al. entdeckt, isoliert und charakterisiert wurden (26). Das Hemmspektrum von Bdellin A umfaßt neben Schweineplasmin auch Humanplasmin; Plasmin spaltet außer Fibrin und Fibrinogen auch Faktor V und VIII, etc., d.h., es kann auch als inaktivierende Verdauungsprotease wirksam werden.
Bdellin B hat zusätzlich eine sehr hohe Affinität zu Akrosin, einem am Befruchtungsvorgang beteiligten Enzym. Das Molekulargewicht von Bdellin A liegt bei ca. 6000, das von Bdellin B bei ca. 5000 (91).
Krejci und Fritz gelang es 1976, die Strukur von Bdellin B_3 teilweise aufzuklären (47).

A. 5. Aufgabenstellung

Im Hinblick auf das breite therapeutische Spektrum der

Blutegelwirkstoffe Hirudin und Eglin ist es von Interesse, ihre Resorptionsfähigkeit durch die Haut bei topischer Applikation zu untersuchen. Am Modell der isolierten Schweinehaut sollte geprüft werden, ob die beiden Inhibitoren bei externer Applikation in Form von Lösung, Salbe oder Gel in der Lage sind, als b i o l o g i s c h a k t i v e Substanzen zu penetrieren. Aus dem Ausmaß der Hautgängigkeit sollte es dann möglich sein, Aussagen über lokale und systemische Wirksamkeit machen zu können.

B. Material und Methoden

B. 1. Substanzen

Enzyme
Test-Thrombin: 30 IU/Flasche vom Rind, Behring-Werke, Marburg; α-Chymotrypsin: krist., 1100 NF Einheiten/mg, Novo Industrie GmbH; Bradykinin von Bachem; Kallikrein: 1030 KE/mg, Bayer Ag Wuppertal;

Substrate
Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid und Tosyl-glycyl-prolyl-arginin-p-nitroanilid von Boehringer Mannheim; Succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-prolyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid von Bachem Feinchemikalien AG;

Albumin aus Humanserum: lyophil., rein, 98% von Serva Feinbiochemica Heidelberg; Phenol-Reagens nach Folin-

Ciocalteu, 1N; Na_2CO_3; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; $KNaC_6H_4O_6 \cdot 4H_2O$; p-Hydroxy-benzoesäure-methylester und -äthylester bzw. -n-propylester (Nipagin M und A bzw. Nipasol), $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, alle von Merck Darmstadt; isotone Kochsalzlösung: 0,9%, steril, pyogenfrei, Braun Melsungen.

Blutegelrohextrakt: 80 ATE/mg; Hirudin reinst: (Charge VL 2507, 16.500 ATE/Flasche) von Fa. Plantorgan, Bad Zwischenahn. Eine spezifische Aktivität bezogen auf die Proteinmenge kann für Hirudin reinst nicht angegeben werden, da das Produkt mit Stabilisatoren versetzt war.
Eglin b: reinst, 150mIU/mg von U. Seemüller (91).

B. 2. Proteinbestimmung nach der Methode von Folin-Ciocalteu (23, 52)

Prinzip
Die außerordentliche Empfindlichkeit der Methode beruht darauf, daß sich 2 Farbreaktionen gleichzeitig abspielen:

a) Die Biuretreaktion der Peptidbindungen mit Kupferionen in alkalischer Lösung, und
b) eine Reduktion der Phosphor-Molybdänsäure und der Phosphor-Wolframsäure durch die in Eiweißmolekülen vorkommenden aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan.

Die Methode ist um den Faktor 100 empfindlicher als die Biuretmethode.

B. 3. Enzymaktivitäts- und Hemmaktivitätsbestimmungen

Bei den Enzymtests handelt es sich um spektralphotometrische Bestimmungen mittels synthetischer Peptidsubstrate. Es wird die katalytische (amidolytische) Aktivität des Enzyms über die Freisetzung des gelben Produktes p-Nitroanilin (pNA) aus dem betreffenden Substrat bestimmt; sie wird bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt. Das pro Minute freigesetzte p-Nitroanilin ist proportional der Enzymaktivität im Bestimmungsansatz. Eine Enzymeinheit (U) ist als die Enzymmenge definiert, die 1 µmol Substrat pro Minute unter den festgelegten Bedingungen hydrolysiert. 1 Inhibitoreinheit (IU) entspricht der Hemmung einer Enzymeinheit.

B. 3. 1. Thrombin-Test (18, 106)

Die Mischung aus 0,02 ml Thrombinlösung (Testthrombin: 30 U in 6 ml 0,25 M Na_3PO_4 gelöst), (0,98 - x) ml Puffer (0,1 M TRA, 0,2 M NaCl, pH 8,4) und x ml Inhibitorlösung wird 5 min bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,125 ml Chromozym TH-Lösung (Inhalt eines Fläschchens gelöst in 10 ml dest. Wasser) gestartet und die Reaktion im Photometer bei 405 nm verfolgt. Bei Verwendung von Halbmikroküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm und 1,125 ml Testvolumen entspricht die Extinktionsänderung von E = 0,0091/min einer Enzymaktivität von 1 mU. Die Verminderung der Extinktionsänderung um E = 0,0091/min entspricht einer Inhibitoraktivität von 1 mIU.
Die Empfindlichkeit der Methode liegt im Bereich von 0,5 - 1 pmol Hirudin entsprechend 10 - 20 pmol/ml.

B. 3. 2. Chymotrypsin-Test

B. 3. 2. 1. Substrat: Suc-L-Phe-Ala-pNA

Die Mischung aus 0,1 ml Chymotrypsinlösung (20 µg Enzym gelöst in 0,0025 N HCl), (1,9 - x) ml Puffer (0,2 M TRA, 0,05 M $CaCl_2$, pH 7,8) und x ml Eglinlösung wird 3 - 5 min bei 25°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von 1 ml Suphepa-Lösung (2,5 mg/ml Substrat in 0,2 M TRA, pH 7,8) gestartet. Die Substrathydrolyse wird 30 min lang durch Messung der Extinktionsänderung pro Minute verfolgt. Die Extinktionsänderung von E = 0,00332/min entspricht einer Enzymaktivität von 1 mU, die Hemmaktivität von 1 mIU analog der Verminderung der Extinktionsänderung um E = 0,00332/min.
Die Empfindlichkeit der Methode liegt im Bereich von 1 - 6 nmol/ml Eglin.

B. 3. 2. 2. Substrat: Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA (13)

Dieser Test ist empfindlicher als der oben beschriebene. Wichtig ist es, alle Operationen in silikonisierten Gefäßen vorzunehmen, um einer Proteinadsorption von Chymotrypsin und Eglin an Oberflächen entgegenzuwirken.
Die Mischung von 0,02 ml Chymotrypsinlösung (2,5 ng/ml Enzym, gelöst in 0,0025 N HCl), (0,58 - x) ml Puffer (0,1 M TRIS/HCl, 0,01 M $CaCl_2$, 0,05% Triton X100, pH 7,8) und x ml Eglinlösung wird 5 min bei 25°C inkubiert. Die enzymatische Reaktion wird durch Zusatz von 0,1 ml Substratlösung (3,5 mM = 2,067 MG/ml) gestartet. Die Extinktionsänderung/min wird über 20 min bei 405 nm (25°C) verfolgt. Enzymaktivität und Hemmaktivität sind

wie oben angegeben definiert.
Die Nachweisgrenze des Tests beträgt 4 - 28 pmol/ml Eglin.

B. 4. Resorptionsmodelle

B. 4. 1. Resorptionsmodell für Lösungen

Für die Resorptionsversuche wurde das Resorptionsmodell nach Stricker der Fa. Sartorius verwendet (Abb. 7). Die Diffusionszellen bestehen aus 2 Kunststoffkammern, zwischen die die Haut als trennende Membran eingespannt wird.
Die Austauschfläche beträgt 40 cm^2 und wird von Silikon-O-Ringen begrenzt und zugleich abgedichtet.
Das Stratum corneum der Haut ist der Kammer I zugewandt, die Innenseite der Haut der Kammer II.
Die beiden Kammern werden aneinandergeschraubt und an den Aussenseiten mit wasserundurchlässigem Leukoplast abgedichtet. Beide Kammern stehen über Silikonschläuche mit jeweils einem Vorratsbehälter in Verbindung. Diese befinden sich in einem Temperiermantel und sind zur Durchmischung der Lösungen mit Magnetrührstäben ausgestattet.
Kammer I und der zugehörige Vorratsbehälter enthalten die zu testende Substanz in wässeriger Lösung, Kammer II mit zugehörigem Vorratsbehälter enthalten physiologische Kochsalzlösung, die die permeierende Substanz aufnehmen soll.
Mit Hilfe einer Rollerpumpe wird eine ständige und kontinuierliche Durchmischung der Lösungen von Kammer

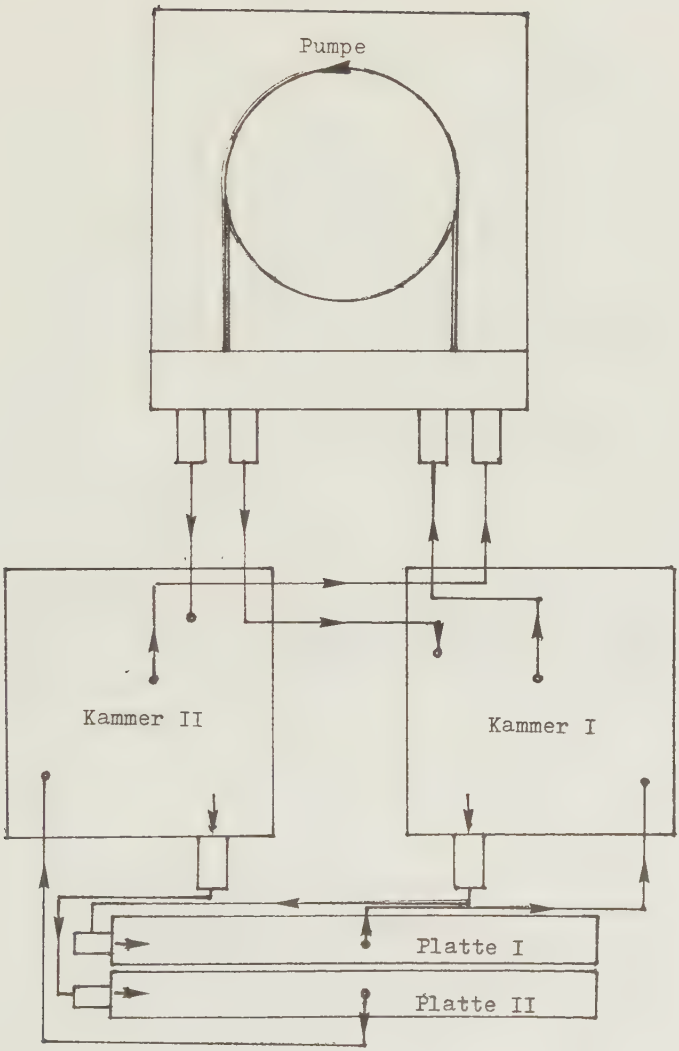

Abb. 7: Resorptionsmodell nach Stricker in schematischer Darstellung

und Vorratsgefäß aufrecht erhalten. Die Fördergeschwindigkeit der Pumpe beträgt 10 - 15 ml/min.

B. 4. 2. Salbenliberationszelle

Für die Versuche mit Salbe wurde die Salbenliberationszelle der Fa. Sartorius verwendet (Abb. 8).
Dieses System besteht aus zwei, durch Bolzen und Muttern zusammengehaltene durchsichtige Plexiglasplatten.
Die der Aussenseite entsprechende Kammer I enthält eine Vertiefung von 5 mm zur Aufnahme der zu testenden Salbe.
Die Riffelfläche der gegenüberliegenden Kammer wird vom Akzeptormedium durchströmt, das in Kontakt mit der Membran den penetrierenden Wirkstoff aufnimmt.
Die Austauschfläche beträgt 16 cm^2.
Da nur geringe Mengen an resorbiertem Wirkstoff zu erwarten sind, werden die Kammern ohne zusätzliche Flüssigkeitsbehälter verwendet und lediglich die Diffusionskammer II und die daran angeschlossenen Silikonschläuche mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Das Gesamtvolumen des Akzeptormediums beträgt 5 ml.
Eine ständige Umwälzung der Lösung wurd durch die Rollerpumpe erreicht.

B. 5. Membran

In allen Resorptionsversuchen wurde als Membran isolierte Schweinehaut verwendet. Die Hautpräparate wurden an den Schenkelinnenseiten frisch geschlachteter Tiere entnommen.

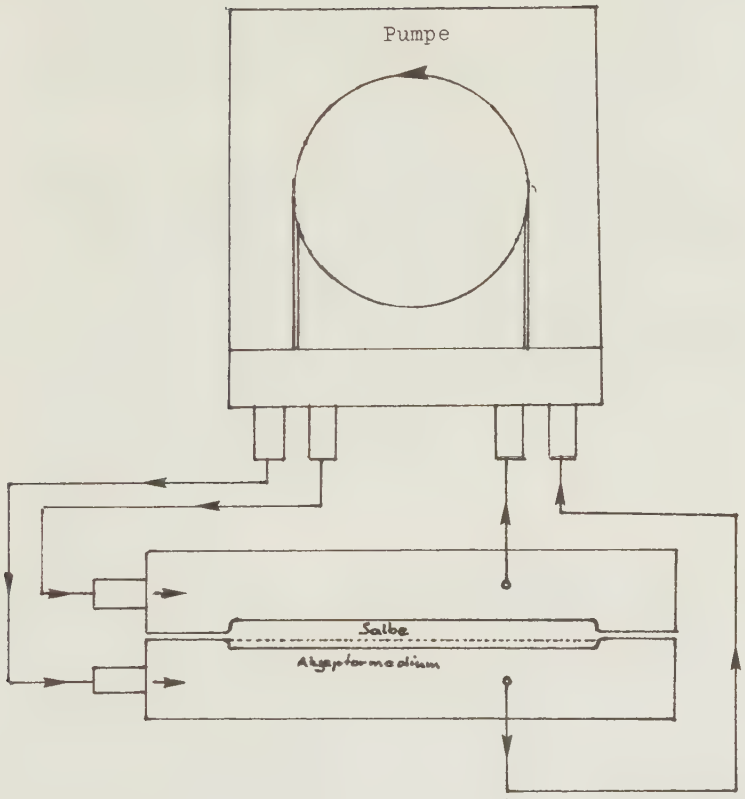

Abb. 8: Salbenliberationszelle in schematischer Darstellung

Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Hautentnahme ca. 10 Minuten tot. Sie hatten ein Wasserbad von 62°C - 63°C durchlaufen und kamen danach für 3 Sekunden in eine Gasbrennkammer, um die Borsten zu entfernen. Anschliessend wurden sie mit einem Messer nachrasiert. Nach Entnahme wurde die Haut sofort in physiologische Kochsalzlösung gelegt und in diesem Medium bis zum Versuchsbeginn (ca. 1 h) aufbewahrt.
Zu Versuchsbeginn wurde unter aseptischen Bedingungen das Unterhautfettgewebe mit einem Einmalskalpell von der Dermis abpräpariert. Die präparierten Hautlappen mit einer Dicke zwischen 1,8 - 3 mm wurden entsprechend dem Kammerdurchmesser auf eine Größe von ca. 8 x 8 cm zugeschnitten.
Es wurde darauf geachtet, daß die Haut keinerlei Verletzungen wie Schnitte oder Abschürfungen aufwies.

B. 6. Resorptionsversuche

B. 6. 1. Resorption von Hirudin und Eglin aus Lösungen

Proteingehalt

Nachdem sich herausgestellt hatte, daß Hirudin in stark verdünnten Lösungen an Glas- und Plastikoberflächen adsorbiert wird, wurde eine Rohextraktlösung (7 mg Rohextrakt/ml physiologischer NaCl-Lösung) auf ihren Proteingehalt getestet. Nach einer Versuchsdauer von 24 h wurde der Proteingehalt in Kammer II (Lösung mit permeiertem Protein) bestimmt, um sicher zu stellen, daß eine ausreichende Proteinmenge permeiert, die Schutz vor Adsorption bietet.

Hemmaktivität des Rohextraktes

5 mg Rohextrakt wurden in 0,8 ml physiologischer NaCl-Lösung gelöst, mit Phosphatpuffer auf pH 7,4 eingestellt und auf 1 ml aufgefüllt.
Mit Hilfe des Suphepa-Tests wurde die Hemmaktivität des Eglins, mit Hilfe des Thrombin-Tests die Hemmaktivität des Hirudins quantitativ ermittelt.

Allgemeine Versuchsdurchführung

Kammer I und Kammer II des Resorptionsmodells wurden mit jeweils 100 ml physiologischer NaCl-Lösung (Kammer II) bzw. Probelösung (Kammer I) gefüllt. Beide Lösungen waren mit Phosphatpuffer auf pH 7,4 eingestellt. Als Konservierungsstoff wurde PHB-Ester (1 Spatelspitze) hinzugefügt. Die mit 100 ml physiologischer NaCl-Lösung bzw. Probenlösung gefüllten Behälter wurden in die entsprechenden Temperiermäntel eingesetzt und mit dem zugehörigen Thermometer versehen. Die Temperatur der Lösungen wurde in beiden Behältern auf $37^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ eingestellt.
Nach dem Aufsetzen der Verteilerköpfe und dem Herstellen der Schlauchverbindungen zwischen Behälter und Diffusionskammer wurde der Versuch gestartet.
Die Versuche liefen über 48 h, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 8, 24, 48 h) Proben von jeweils 0,5 ml aus den Versuchslösungen entnommen und auf Hemmaktivität getestet wurden.
Das durch die Probenentnahmen verursachte Volumendefizit wurde durch Zugabe von jeweils 0,5 ml physiologischer NaCl-Lösung ausgeglichen.
Am Ende des Versuches wurde auch die Lösung der Kammer I auf Hemmaktivität ausgetestet.
Entsprechend dieser allgemeinen Vorschrift wurden alle im folgenden beschriebenen Versuche mit Lösungen durchgeführt. Bei den speziellen Beschreibungen wird deswegen nur auf die variablen Parameter eingegangen.

Alle waschbaren Bestandteile des Resorptionsmodells wurden nach jedem Versuch für einige Stunden in einer Reinigungslösung desinfiziert. Nach dem Klarspülen mit Leitungswasser wurden alle Teile bei Raumtemperatur getrocknet.

Kontrollversuch

Beide Kammern wurden mit jeweils 100 ml physiologischer NaCl-Lösung beschickt, die mit Phosphatpuffer auf pH 7,4 eingestellt und mit PHB-Ester versetzt worden war. Der Versuch wurde analog der allgemeinen Versuchsbeschreibung (s.S. 31) durchgeführt und diente dem Nachweis, daß während der Versuchsdauer keine Substanzen aus der Schweinehaut freigesetzt werden, die die verwendeten Testsysteme für Hirudin und Eglin beeinflussen.

B. 6. 1. 1. Resorption aus Rohextraktlösung

B. 6. 1. 1. 1. Zeitabhängigkeit

Durch relativ engmaschige Probenentnahmen nach 2, 4, 6 h zu Beginn wurde untersucht, zu welchem Zeitpunkt erstmals Hirudin und Eglin in Kammer II nachzuweisen sind. Die übrigen Probenentnahmen dienten der Untersuchung des Resorptionsverhaltens der beiden Inhibitoren in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Exposition der Schweinehaut mit der Wirkstofflösung.

B. 6. 1. 1. 2. Abhängigkeit der Resorption von der Wirkstoffkonzentration

Es wurde die Resorption von Hirudin und Eglin aus Blutegelrohextrakt in Abhängigkeit von der Rohextraktmenge untersucht.

Dazu wurden 500, 700, 800 und 1000 mg Rohextrakt in 100 ml Lösung eingesetzt (Hirudinkonzentration: 12 - 27,7 IU/ml; Eglinkonzentration: 25,1 - 59,4 mIU/ml). Jeder Versuch wurde zweimal wiederholt.

B. 6. 1. 1. 3. Abhängigkeit der Resorption von der Temperatur

Mit einer Blutegelrohextraktlösung von 500 mg Rohextrakt in 100 ml physiologischer NaCl-Lösung wurde die Temperaturabhängigkeit der Resorption von Hirudin und Eglin untersucht.
Es wurden Versuche bei 21, 29, 34 und 37°C durch entsprechende Regulierung der Temperatur in den Temperiermänteln der beiden Behälter durchgeführt. Die Probenaustestungen erfolgten nach 24 und 48 h.

B. 6. 1. 1. 4. Abhängigkeit der Resorption von Zusatzstoffen

Einer Lösung von 700 mg Blutegelrohextrakt in 100 ml physiologischer NaCl-Lösung wurde in verschiedenen Versuchen 1 mg Bradykinin und 1 bzw. 5 mg Kallikrein zugesetzt.
Bei einer anderen Versuchsreihe erfolgte der Zusatz von 50 bzw. 100 mg Hyaluronidase zu einer Lösung von 500 mg Blutegelrohextrakt in 100 ml physiologischer NaCl-Lösung.
Der zeitliche Verlauf der Probenentnahme wurde entsprechend der allgemeinen Versuchsbeschreibung vorgenommen (s.S. 31).

B. 6. 1. 2. Resorption aus Reinsubstanzlösungen

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an Reinsubstanzen wurde das Kammervolumen von 100 ml auf 50 ml reduziert.

Ansonsten erfolgt die Versuchsdurchführung analog wie auf Seite 31 beschrieben.

B. 6. 1. 2. 1. Hirudin

Verwendung fand reines Hirudin (774,2 IU/50 ml, s.S. 23) der Fa. Plantorgan, das mit Stabilisatoren versetzt war. Um eine Adsorption des Hirudins an die Kammeroberflächen zu verhindern, wurde den Lösungen in Kammer I und II je 5 mg Humanalbumin zugesetzt.
Zu Beginn des Versuches wurde die Lösung der Kammer I zur Beurteilung der Reinheit des Hirudins auf Hemmaktivität gegenüber den anderen bekannten Inhibitoren des Blutegels (Eglin und Bdelline) geprüft.
Aus Gründen der Materialersparnis wurden nach Abschluß des Versuches die Lösungen von Kammer I und Kammer II vereinigt und eingeengt. Nach einer Dialyse von 5 h gegen destilliertes Wasser wurde die Lösung lyophilisiert und für den Wiederholungsversuch verwendet. Für diesen verblieb eine Hirudinaktivität von 680 IU.

B. 6. 1. 2. 2. Eglin

Für die Tests mit Eglin als Reinsubstanz wurde Eglin b mit einer spezifischen Aktivität von 150 mIU/mg verwendet. Für die Kammer I-Füllung wurden in 50 ml physiologischer NaCl-Lösung 755 mIU Eglin b (5 mg) und 5 mg Humanalbumin gelöst.
Vor Versuchsbeginn wurde eine der Kammer I entnommene Probe außer auf Eglingehalt auch auf Hirudin- und Bdellingehalt getestet.
Nach Abschluß der Versuche wurden die Lösungen beider Kammern vereinigt, eingeengt, dialysiert und lyophilisiert (s. Hirudin, S.34). Für die Wiederholungsversuche standen noch 737,5 mIU Eglin b zur Verfügung.

B. 6. 2. Resorption von Hirudin und Eglin aus Zubereitungen

B. 6. 2. 1. Gel

Es wurde ein Exhirud^{R}-Gel mit 500 ATE/g der Fa. Plantorgan verwendet.
Bei jedem Versuch wurden 2 g Gel mit einem Holzspatel auf die Haut aufgebracht. Danach wurde das Gel mit dem behandschuhten Finger in die Haut möglichst vollständig einmassiert.
Unter Umgehung der Kammer II wurden nur das Schlauchsystem und die Diffusionskammer mit 5 ml physiologischer NaCl-Lösung gefüllt, die 1 mg Hamanalbumin und 1 Spatelspitze PHB-Ester enthielt.
Da die Lösung nicht über den Behälter (Kammer II) im Temperiermantel zirkulierte, fanden diese Versuche bei Raumtemperatur statt (21 °C).
Jeder Versuch lief über einen Zeitraum von 48 h und wurde zweimal wiederholt.

B. 6. 2. 2. Salbe

Für diese Versuche wurde Exhirud^{R}-Salbe mit 500 ATE/g der Fa. Plantorgan verwendet, wobei 1, 2, 5 und 10 g Salbe appliziert wurden.
Jeder Versuch wurde zweimal wiederholt.
Die abgewogene Salbenmenge wurde mit einem Holzspatel auf die Schweinhaut aufgetragen.
In den beiden ersten Versuchen mit 10 g Salbe wurde diese nicht einmassiert. Bei allen anderen Durchgängen wurde die Salbe in die Haut einmassiert.
Die Versuchsdurchführung erfolgt wie oben beschrieben (Gel, S. 35).

Für die Versuche mit 10 g Salbe wurde der Akzeptorlösung 1 mg Humanalbumin pro 5 ml zugesetzt, für alle übrigen Versuche 0,5 mg/5 ml.
Es wurde bei Raumtemperatur (21°C) gearbeitet.

C. Ergebnisse

Definitionen der verwendeten Begriffe

Für die Beurteilung der Resorptionsvorgänge ist die Permeationskonstante nicht geeignet, da sich diese Größe in einer inhomogenen Membran, wie die Haut sie darstellt, mit zunehmender Tiefe exponentiell abfallend ändert.
Zur Beschreibung und Beurteilung des Resorptionsverhaltens von Stoffen durch die Haut wurden daher die Begriffe der Hautpermeationsrate (HPR) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) eingeführt (73).
Die HPR ist die aus einer Lösung, Salbe, Creme oder einem Gel durch die Epidermis hindurchtretende Masse eines Stoffes, bezogen auf die Flächeneinheit der Hautoberfläche und Zeiteinheit. Die HPR beschreibt den nach einer Verzögerungszeit einsetzenden konstanten und maximalen Massenfluß zwischen den Konzentrationsgradienten c_1 und c_2, wobei c_1 die Konzentration auf der Hautaussenseite und c_2 an der Hautinnenseite ist. Die HPR ist also konzentrationsabhängig. Die Dimension wird in $mol \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bzw. $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ oder für den Aktivitätsdurchtritt in $IU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ angegeben.
Die SHPR ist der Quotient aus HPR und der Konzentration des Inhibitors in der verwendeten Zubereitung (Lösung, Gel, Salbe) und ist damit konzentrationsunabhängig. Sie dient als vergleichbare Größe zur Beschreibung stoffspezifischer Permeationseigenschaften und ist definiert als $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bzw. $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$.

C. 1. Kontrollversuche

Proteingehalt (vgl. B. 6. 1. , s.S. 30)

Es sollte nachgewiesen werden, daß aus dem Rohextrakt Proteine in ausreichender Menge durch die Membran resorbiert werden, die die Adsorption von Hirudin und Eglin an Glas- und Plastikoberflächen verhindern.
Nach 24 h wurde der Proteingehalt der Kammer II geprüft. Er betrug 16 - 20% des Proteingehalts der Ausgangslösung. Diese Proteinmenge müßte ausreichenden Schutz vor der Adsorption von Hirudin und Eglin an Glas und Plastik bieten.
Die Versuche mit Rohextrakt können dadurch ohne Zusatz von Albumin durchgeführt werden.

Kontrollversuch (vgl. B. 6. 1. , s.S. 32)

Es wurde untersucht, ob während des Versuchs Substanzen aus der Schweinehaut freigesetzt werden, die evt. die verwendeten Testsysteme für Hirudin und Eglin beeinflussen.
Nach einer Versuchsdauer von 24 h konnten keine diesbezüglichen Inhibitoraktivitäten oder Enzymaktivitäten in den Lösungen der Kammer I und II nachgewiesen werden, d.h. es wurden keine Proteinaseinhibitoren oder Proteinasen mit thrombin- bzw. chymotrypsinähnlicher Wirkung aus der Schweinehaut freigesetzt, die die Tests auf Hirudin bzw. Eglin hätten verfälschen können.

C. 2. Resorption von Hirudin und Eglin aus Lösungen

C. 2. 1. Resorption von Hirudin und Eglin aus Rohextraktlösungen

Als wesentliches Ergebnis dieser Versuchsreihe ergibt sich, daß die Permeation der Blutegelwirkstoffe Hirudin und Eglin (aus Lösungen) durch die isolierte Schweinehaut in Form der biologisch aktiven Inhibitoren erfolgt.

C. 2. 1. 1. Zeitabhängigkeit
(vgl. B. 6. 1. 1. 1. auf Seite 32, sowie Abb. 9 und Tab. 1a, b)

Es sollte überprüft werden, ob eine lineare Abhängigkeit zwischen Permeationsrate und der Permeationsdauer von Hirudin und Eglin besteht.
Engmaschige Probenentnahmen in den ersten Versuchen zeigten, daß in den ersten 3 - 4 h in Kammer II nur äußerst geringe Hemmaktivitäten gegen Thrombin bzw. Chymotrypsin zu finden waren. Im Zeitraum von 4 - 8 h bzw. 20 h wurden dann kontinuierlich ansteigende Inhibitoraktivitäten gemessen. In dieser ersten Phase sind die Resorptionskurven noch nicht linear. Zahlenmäßig drückt sich das in den Standardhautpermeationsraten für Hirudin und Eglin aus (vgl. Tab. 1). Sie sind in den ersten 4 h sehr niedrig (Hirudin: 0,63 - 2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; Eglin: 0) und steigen dann in den nächsten 4 h etwas an (Hirudin: bis 3 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; Eglin: bis 7,8 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$). Einen linearen Verlauf der Permeationskurven für Hirudin und Eglin beobachtet man nach 8 bzw. spätestens

Rohextraktlösung		Zeitintervall	Hemmaktivität in Kammer II	Hautpermeationsrate		SHPR
mg/ml	IU/ml	h	IU	$mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	$ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	$\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
5	12,52	0 - 4	0,83	5,2	7,9	0,63
		4 - 8	0,40	2,5	3,8	0,20
		8 - 24	21,76	34,0	51,5	2,70
		24 - 48	70,08	73,0	110,6	5,80
7	17,45	0 - 4	2,85	17,8	27,0	1,00
		4 - 8	4,16	26,0	39,4	1,50
		8 - 24	44,16	69,0	104,5	3,95
		24 - 48	69,12	72,0	109,1	4,10
8	24,67	0 - 4	7,78	48,6	73,6	1,97
		4 - 8	12,00	75,0	113,6	3,04
		8 - 24	78,72	123,0	186,4	4,99
		24 - 48	133,44	139,0	210,6	5,63
10	21,42	0 - 4	4,84	30,25	45,8	1,41
		4 - 8	5,26	32,90	49,8	1,54
		8 - 24	65,92	103,00	156,1	4,81
		24 - 48	207,84	216,50	328,0	10,10

Tab. 1a: Hirudinresorption:

Zeitabhängigkeit der Hautpermeationsrate (HPR) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung

1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22 nmol Hirudin

Rohextraktlösung		Zeitintervall	Hemmaktivität in Kammer II	Hautpermeationsrate		SHPR
mg/ml	mIU/ml	h	mIU	$mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	$ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	$\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
5	25,6	0 - 4	-	-	-	-
		4 - 8	73,6	0,46	3067	17,97
		8 - 24	60,1	0,09	627	3,67
		24 - 48	86,4	0,09	600	3,50
7	43,0	0 - 4	-	-	-	-
		4 - 8	43,2	0,27	1800	6,30
		8 - 24	160,0	0,25	1667	5,80
		24 - 48	201,6	0,21	1400	4,90
8	50,0	0 - 4	-	-	-	-
		4 - 8	62,4	0,39	2600	7,80
		8 - 24	243,2	0,38	2533	7,60
		24 - 48	288,0	0,30	2000	6,00
10	59,4	0 - 4	-	-	-	-
		4 - 8	46,4	0,29	1933	4,88
		8 - 24	358,4	0,56	3733	9,40
		24 - 48	134,4	0,14	933	2,36

Tab. 1b: Eglinresorption:

Zeitabhängigkeit der Hautpermeationsrate (HPR) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung

1 mIU entspricht 6,67 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin

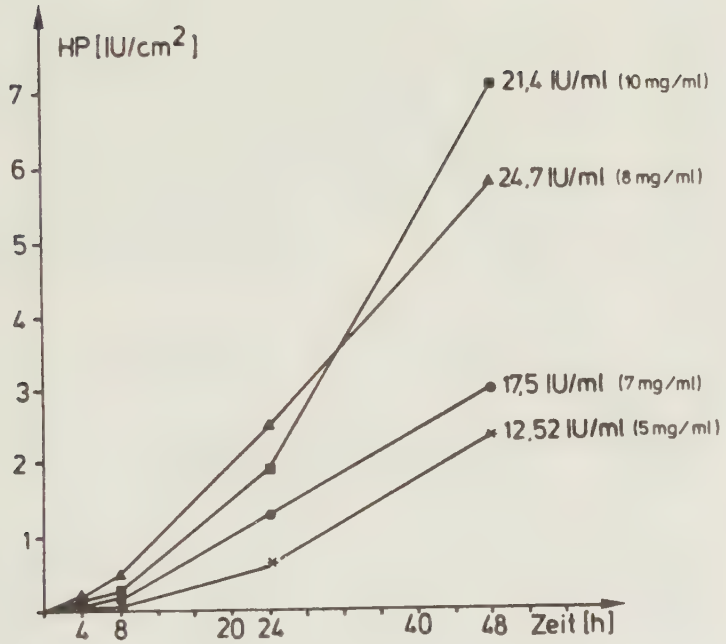

Abb. 9a: Hirudinresorption
Zeitabhängigkeit der Hautpermeation bei einer Versuchsdauer von 48 Stunden
(vgl. C. 2. 1. 1. auf Seite 38)

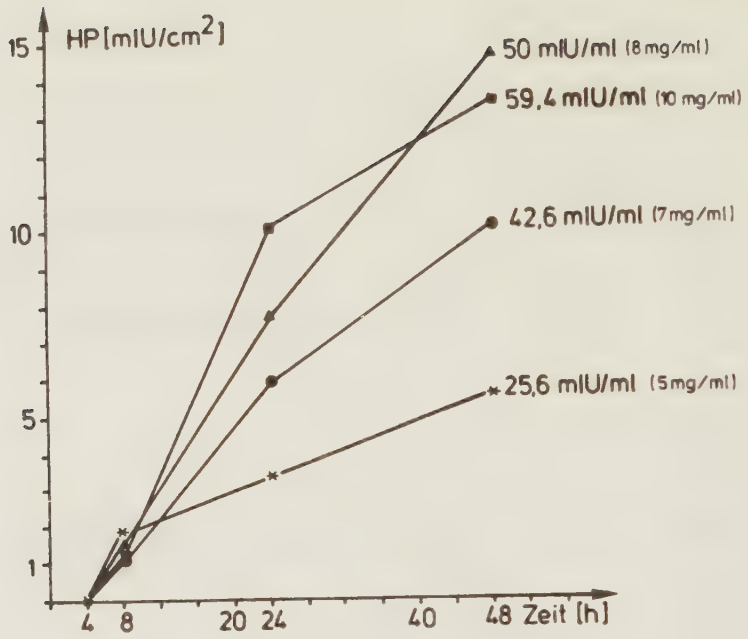

Abb. 9b: Eglinresorption
Zeitabhängigkeit der Hautpermeation bei einer Versuchsdauer von 48 Stunden
(vgl. C. 2. 1. 1. auf Seite 38)

nach 24 h. Der genaue Zeitpunkt des Beginns der Linearität kann aus den experimentellen Daten nicht ermittelt werden, da im Zeitraum zwischen 8 und 48 h nur 2 Proben (nach 24 und 48 h) entnommen wurden.
Im linearen Kurvenverlauf (24 - 48 h) bleibt die SHPR für beide Inhibitoren konstant: Es besteht ein maximaler Fluß und damit auch maximale Resorption ($SHPR_{Hirudin}$: 5,2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: 4,8 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).
Bei diesen aus den verschiedenen gemessenen Konzentrationen gemittelten Werten wurden die Ergebnisse des Versuches mit 10 mg/ml Rohextrakt unberücksichtigt gelassen.

C. 2. 1. 2. Abhängigkeit der Resorption von der Rohextraktkonzentration
(vgl. B. 6. 1. 1. 2. auf Seite 32 sowie Abb. 10 und Tab. 2, 3 und 4)

Ziel dieser Versuchsreihe war die Aufklärung der Abhängigkeit der Resorptionsrate von der Rohextrakt- bzw. Inhibitorkonzentration.
Verwendung fand Blutegelrohextrakt in einer Konzentration von 5, 7, 8 und 10 mg pro ml Lösung.
Die Ergebnisse sind für beide Inhibitoren graphisch in Abb. 10 und tabellarisch in Tab. 2, 3 und 4 wiedergegeben. Aus Abb. 10 a und b ergibt sich eine weitgehend lineare Abhängigkeit der Hautpermeationsrate von der Rohextraktkonzentration. Die mehr oder weniger starke Streuung der Werte ist sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche Schweinehautpräparationen zurückzuführen.

Für Hirudin ergibt sich eine Hautpermeation nach 48 h von 2,4 - 7,1 $IU \cdot cm^{-2}$ entsprechend 3,6 - 10,2 $\mu g \cdot cm^{-2}$.
Die HPR beträgt zu diesem Zeitpunkt 0,05 - 0,15 $IU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ entsprechend 75 - 225 $ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$.

Rohextraktlösung		Hautpermeation ($IU \cdot cm^{-2}$) nach				Hautpermeationsrate ($mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach			
mg/ml	IU/ml	4 h	8 h	24 h	48 h	4 h	8 h	24 h	48 h
5	12,52	0,021	0,073	0,62	2,37	5,2	9,1	25,8	49,3
7	17,45	0,071	0,175	1,28	3,01	17,75	21,88	53,33	62,7
8	24,67	0,194	0,494	2,46	5,8	48,5	61,75	102,5	120,83
10	21,42	0,121	0,253	1,91	7,1	30,25	31,6	79,58	147,92

Tab. 2a: Hirudinresorption:

Konzentrationsabhängigkeit der Hautpermeation (HP) und Hautpermeationsrate (HPR) aus Rohextraktlösung bei einer Versuchsdauer von 48 Stunden

1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22 nmol Hirudin

Rohextraktlösung		Hautpermeation ($mIU \cdot cm^{-2}$) nach				Hautpermeationsrate ($mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach			
mg/ml	mIU/ml	4 h	8 h	24 h	48 h	4 h	8 h	24 h	48 h
5	25,6	-	1,84	3,34	5,5	-	0,23	0,139	0,115
7	42,6	-	1,08	5,08	10,1	-	0,135	0,212	0,21
8	50	-	1,56	7,64	14,84	-	0,195	0,318	0,309
10	59,4	-	1,16	10,12	13,48	-	0,145	0,422	0,281

Tab. 2b: Eglinresorption:

Konzentrationsabhängigkeit der Hautpermeation (HP) und Hautpermeationsrate (HPR) aus Rohextraktlösung bei einer Versuchsdauer von 48 Stunden

1 mIU entspricht 6,67 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin

Rohextrakt-lösung mg/ml	HA* Kammer I IU	Molarität Kammer I µM	HA Kammer II IU	Molarität Kammer II µM	HA Kammer II / HA Kammer I %	Hautpermeation 0 - 48 h $IU \cdot cm^{-2}$	SHPR $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
5	12,52	2,7	94,7	0,20	7,5	2,4	4,0
7	17,45	3,78	120,3	0,26	7	3	3,6
8	24,67	5,34	232	0,5	9,9	5,8	4,9
10	21,42	4,64	284	0,61	12	7,1	6,9

Tab. 3a: Hirudinresorption:
Hautpermeation (HP) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) nach 48 Stunden

*HA = Hemmaktivität

Rohextrakt-lösung mg/ml	HA* Kammer I mIU	Molarität Kammer I µM	HA Kammer II mIU	Molarität Kammer II µM	HA Kammer II / HA Kammer I %	Hautpermeation 0 - 48 h $mIU \cdot cm^{-2}$	SHPR $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
5	2560	21	220	1,82	8,8	5,5	4,5
7	4300	35,4	405	3,32	9,6	10,1	4,9
8	5000	41,2	593	4,84	12	14,84	6,2
10	5940	48,9	539	5,26	11,6	13,48	4,7

Tab. 3b: Eglinresorption:
Hautpermeation (HP) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) nach 48 Stunden

*HA = Hemmaktivität

Rohextrakt-lösung IU/ml	0 - 48 h		24 - 48 h	
	HPR $mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	SHPR $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	HPR $mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	SHPR $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
12,52	50	4	73	5,83
17,45	62,5	3,58	72	4,13
24,67	120,8	4,9	139	5,63
21,42	147,9	6,9	216,5	10,1

Tab. 4a: Hirudinresorption:
Abhängigkeit der Hautpermeationsrate (HPR) von der Rohextraktkonzentration;
Vergleich der Zeitintervalle 0 - 48 Stunden und 24 - 48 Stunden (vgl. Abb. 10a)

1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22 nmol Hirudin

Rohextrakt-lösung mIU/ml	0 - 48 h HPR $mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	0 - 48 h SHPR $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	24 - 48 h HPR $mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	24 - 48 h SHPR $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
25,6	0,09	3,5	0,11	4,5
43,0	0,21	4,9	0,21	4,9
50,0	0,30	6,0	0,31	6,2
59,4	0,14	2,4	0,28	4,7

Tab. 4b: Eglinresorption:
Abhängigkeit der Hautpermeationsrate (HPR) von der Rohextraktkonzentration
Vergleich der Zeitintervalle 0 - 48 Stunden und 24 - 48 Stunden (vgl. Abb. 10b)

1 mIU entspricht 6,67 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin

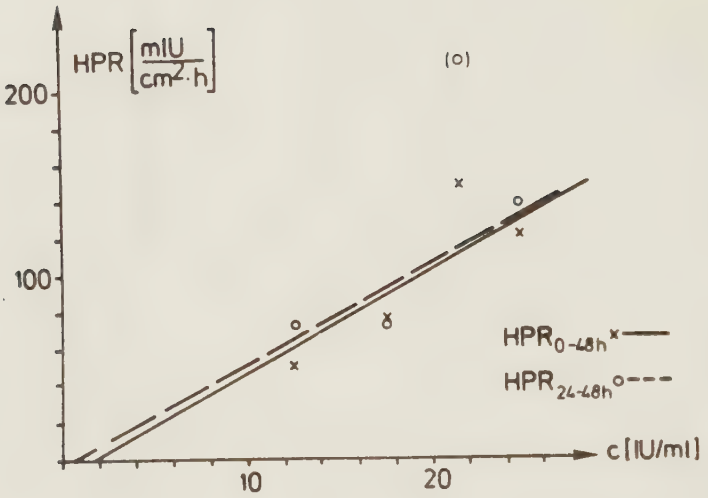

Abb. 10a: Hirudinresorption
Abhängigkeit der Hautpermeationsrate (HPR) von der Wirkstoffkonzentration in der Rohextraktlösung
(vgl. C. 2. 1. 2. auf Seite 43)

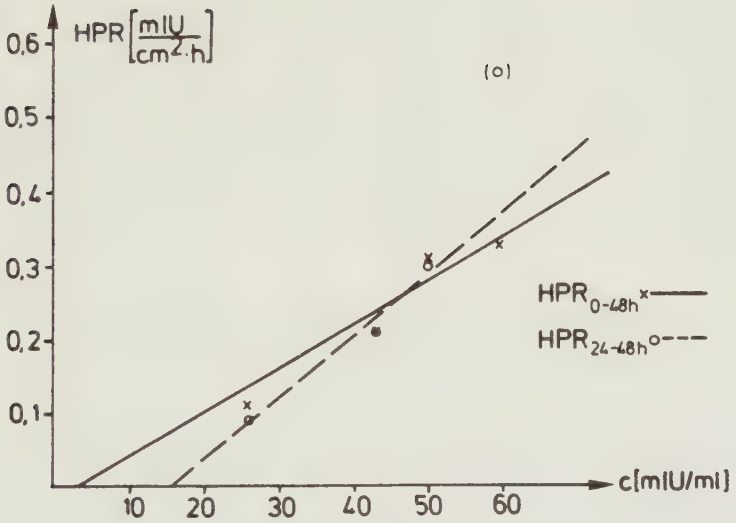

Abb. 10b: Eglinresorption
Abhängigkeit der Hautpermeationsrate (HPR) von der Wirkstoffkonzentration in der Rohextraktlösung
(vgl. C. 2. 1. 2. auf Seite 43)

Für die Hautpermeation des Eglins nach 48 h erhält man Werte von 5,5 - 13,5 mIU·cm^{-2} entsprechend 36,7 - 89,9 µg·cm^{-2}. Die HPR liegt bei Werten von 0,115 - 0,281 mIU·cm^{-2}·h^{-1} entsprechend 0,76 - 1,87 µg·cm^{-2}·h^{-1} (vgl. Tab. 2a und b).
Die SHPR, gemittelt über 48 h, liegt für Hirudin bei 4,2 µl·cm^{-2}·h^{-1} und für Eglin bei 4,8 µl·cm^{-2}·h^{-1}, sofern die Versuche mit der Konzentration von 10 mg/ml nicht berücksichtigt werden. Die maximale SHPR von Lösungen beträgt dabei für Hirudin 5,2 µl·cm^{-2}·h^{-1} und für Eglin ebenfalls 5,2 µl·cm^{-2}·h^{-1} (vgl. Tab. 4a und b). Die maximale SHPR, die im linearen Bereich der Kurven ermittelt wird (24 - 48 h), ist für beide Inhibitoren gleich: Hirudin und Eglin können demnach aus dem Rohextrakt die Schweinehaut gleich gut permeieren.

C. 2. 1. 3. Temperaturabhängigkeit
(vgl. B. 6. 1. 1. 3. auf Seite 33 sowie Abb. 11 und Tab. 5a und b)

In den Temperaturversuchen sollte geklärt werden, ob sich eine Korrelation zwischen Permeationsrate und Temperatur herstellen läßt. Es wurde dazu die Resorption von Hirudin und Eglin aus einer Lösung von 5 mg/ml Rohextrakt bei 21, 29, 34 und 37°C getestet.
Unter den gewählten Bedingungen wurde sowohl für Hirudin als auch für Eglin die günstigste Resorptionsrate bei 37°C erreicht. Die niedrigste Durchtrittsrate fand sich bei 21°C, die bei 29°C leicht ansteigt, um dann bei 37°C das Maximum zu erreichen. Es ist nicht ausgeschlossen, daß eine Erhöhung der Temperatur über 37°C zu einer weiteren Steigerung der Permeation führt.

Temperatur °C	Rohextraktlösung IU/ml	HA Kammer II IU	Hautpermeation 0 - 48 h mIU·cm^{-2}	SHPR µl·cm^{-2}·h^{-1}
21	18	37,8	0,95	1,1
29	20	60	1,5	1,6
34	27,6	110	2,8	2,1
37	21,42	284	7,1	6,9

Tab. 5a: Hirudinresorption:

Temperaturabhängigkeit der Hautpermeation und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung bei einer Versuchsdauer von 48 Stunden

1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22 nmol Hirudin

Temperatur °C	Rohextraktlösung mIU/ml	HA Kammer II mIU	Hautpermeation 0 - 48 h $mIU \cdot cm^{-2}$	SHPR $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
21	32,7	140	3,5	2,2
29	46	147	3,68	1,7
34	47,7	262	6,55	2,9
37	43	405	10,1	4,9

Tab. 5b: Eglinresorption:

Temperaturabhängigkeit der Hautpermeation und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung bei einer Versuchsdauer von 48 Stunden

1 mIU entspricht 6,67 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin

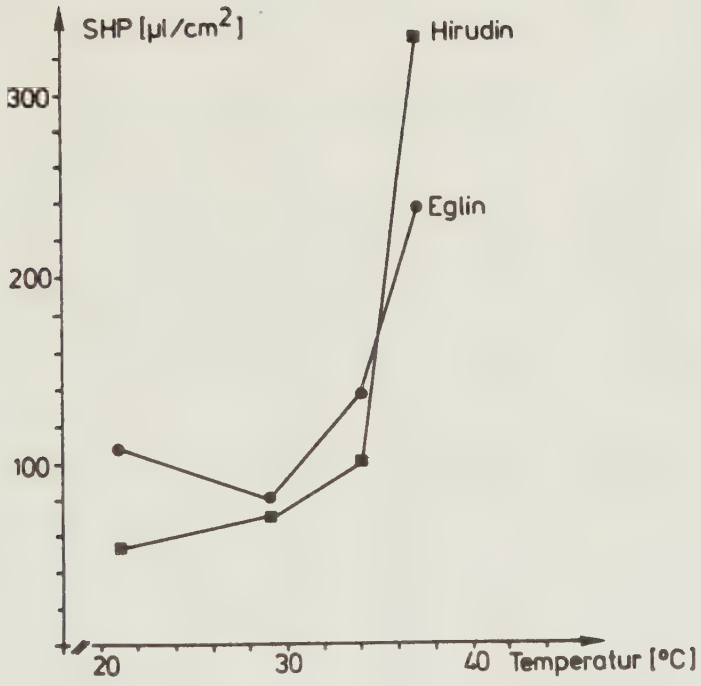

Abb. 11: Abhängigkeit der Standardhautpermeation (SHP) von der Temperatur
Vergleich von Hirudin (■) und Eglin (●)
(vgl. C. 2. 1. 3. auf Seite 52)

C. 2. 1. 4. Abhängigkeit der Resorption von Zusatzstoffen
(vgl. B. 6. 1. 1. 4. auf Seite 33 sowie Abb. 12 und 13, Tab. 6 und 7)

Durch den Zusatz verschiedener Substanzen wurde versucht, die Resorption von Hirudin und Eglin zu steigern.
Die Zugabe von Bradykinin und Kallikrein in einer Konzentration von 10 µg/ml bzw. 10 µg und 50 µg/ml hatte keinen Effekt auf die Hautpermeation. In die betreffenden Abbildungen 12a und b wurden zum Vergleich Kurven eingezeichnet, die mit entsprechender Rohextrakt- bzw. Inhibitorkonzentration erhalten wurden. Aus Tab. 6a und b zeigt sich, daß die Standardhautpermeationsrate (SHPR) für Hirudin und Eglin mit den angegebenen Zusätzen keine signifikanten Unterschiede aufweisen.
Anders verhält es sich dagegen bei Zusatz von 0,5 bzw. 1 mg/ml Hyaluronidase (Abb. 13, Tab. 7). Der Zusatz von 0,5 mg/ml Hyaluronidase bewirkt für beide Inhibitoren eindeutig eine Verbesserung der Resorption:
Die SHPR zwischen 0 und 48 h steigt für Hirudin von 3,57 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ (ohne Zusatz) auf 5,17 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; das bedeutet eine Steigerung um den Faktor 1,45. Für Eglin steigt die SHPR zwischen 0 und 48 h von 4,94 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ auf 8,03 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$. Daraus ergibt sich ein Faktor von 1,63. Der Anstieg der Permeation durch den Zusatz von 0,5 mg/ml Hyaluronidase ist also für die beiden Inhibitoren ungefähr gleich stark.
Eine Konzentrationserhöhung der Hyaluronidase auf 1mg/ml hatte dagegen keinen Effekt auf die Resorptionsrate.
Die SHPR für Hirudin und Eglin liegen hier in derselben Größenordnung wie für Rohextrakt allein.

Wirkstoffkonzentration		Hautpermeation ($IU \cdot cm^{-2}$) nach			SHPR ($\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach
Rohextraktlösung IU/ml	Zusatzstoff µg/ml	4 h	24 h	48 h	48 h
24,7	-	0,197	2,48	5,8	4,89
29,3	Kinin 10	0,15	4,03	8,79	6,25
27,6	Kallikrein 10	0,19	3,93	7,31	5,52
29,5	Kallikrein 50	0,09	2,88	6,2	4,38

Tab. 6a: Hirudinresorption:

Abhängigkeit der Hautpermeation und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung unter Zusatz von Kinin und Kallikrein

1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22 nmol Hirudin

Wirkstoffkonzentration		Hautpermeation ($mIU \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach			SHPR ($\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach
Rohextraktlösung mIU/ml	Zusatzstoff µg/ml	4 h	24 h	48 h	48 h
50	-	-	7,65	14,7	6,13
50	Kinin . 10	-	5	11,25	4,69
51	Kallikrein 10	-	7,4	15,2	6,21
48,5	Kallikrein 50	-	5,82	9,46	4,06

Tab. 6b: Eglinresorption:
Abhängigkeit der Hautpermeation und Standardhautpermeationsrate (SHPR) Rohextraktlösung unter Zusatz von Kinin und Kallikrein
1 mIU entspricht 6,67 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin

Wirkstoffkonzentration		Hautpermeation ($IU \cdot cm^{-2}$) nach			SHPR ($\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach
Rohextrakt-lösung IU/ml	Hyaluronidase mg/ml	4 h	24 h	48 h	48 h
17,5	-	0,071	1,28	3	3,57
22,55	0,5	0,3	2,4	5,6	5,17
22,42	1	nicht gemessen	1,68	3	2,79

Tab. 7a: Hirudinresorption:

Abhängigkeit der Hautpermeation und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung unter Zusatz von Hyaluronidase in unterschiedlicher Konzentration

1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22 nmol Hirudin

Wirkstoffkonzentration Rohextraktlösung	Hyaluronidase	Hautpermeation ($mIU \cdot cm^{-2}$) nach			SHPR ($\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach
mIU/ml	mg/ml	4 h	24 h	48 h	48 h
42,6	-	-	5,89	10,1	4,94
34,5	0,5	-	10,35	13,3	8,03
37,7	1	-	7,26	9,8	5,42

Tab. 7b: Eglinresorption:

Abhängigkeit der Hautpermeation und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung unter Zusatz von Hyaluronidase in unterschiedlicher Konzentration

1 mIU entspricht 6,67 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin

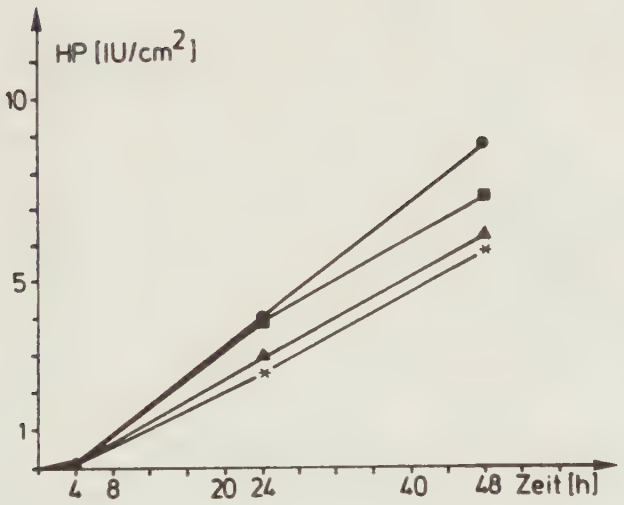

Abb. 12a: Hirudinresorption
Abhängigkeit der Hautpermeation (HP) von verschiedenen Zusatzstoffen

- * 24,7 IU/ml Rohextraktlösung
- ■ 27,6 IU/ml Rohextraktlösung + 10 µg/ml Kallikrein
- ▲ 29,5 IU/ml Rohextraktlösung + 50 µg/ml Kallikrein
- • 29,3 IU/ml Rohextraktlösung + 10 µg/ml Kinin

(vgl. C. 2. 1. 4. auf Seite 56)

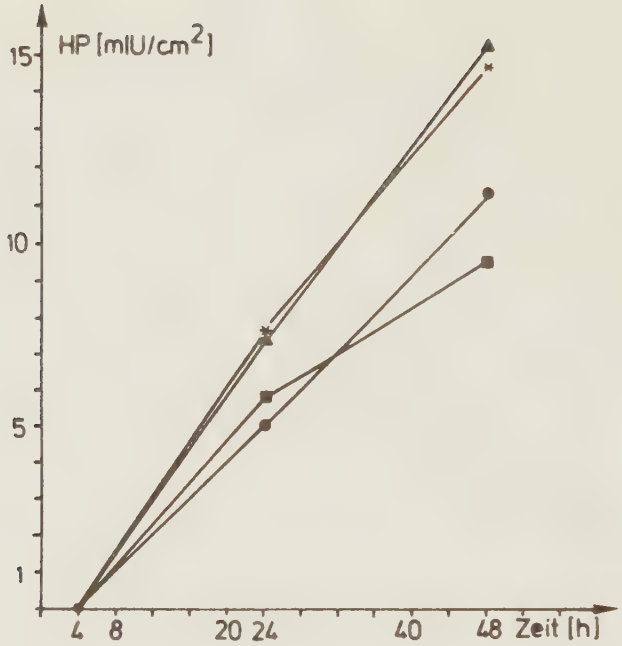

Abb. 12b: Eglinresorption
Abhängigkeit der Hautpermeation (HP) von verschiedenen Zusatzstoffen

- * 50 mIU/ml Rohextraktlösung
- ▲ 51 mIU/ml Rohextraktlösung + 10 µg/ml Kallikrein
- ■ 48,5 mIU/ml Rohextraktlösung + 50 µg/ml Kallikrein
- ● 50 mIU/ml Rohextraktlösung + 10 µg/ml Kinin

(vgl. C. 2. 1. 4. auf Seite 56)

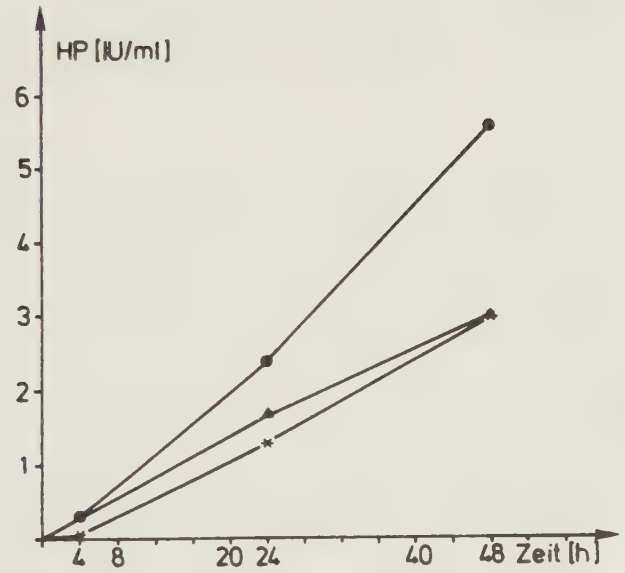

Abb. 13a: Hirudinresorption
Abhängigkeit der Hautpermeation (HP) vom Zusatz von Hyaluronidase in verschiedenen Konzentrationen
* 17,5 IU/ml Rohextraktlösung
▲ 22,4 IU/ml Rohextraktlösung + 1 mg/ml Hyaluronidase
● 22,5 IU/ml + 0,5 mg/ml Hyaluronidase
(vgl. C. 2. 1. 4. auf Seite 56)

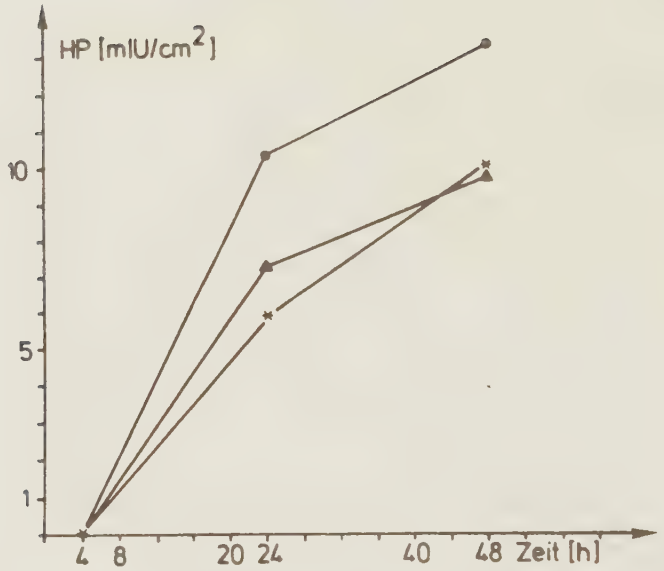

Abb. 13b: Eglinresorption
Abhängigkeit der Hautpermeation (HP) vom Zusatz von Hyaluronidase in verschiedenen Konzentrationen

- * 42,6 mIU/ml Rohextraktlösung
- ● 34,5 mIU/ml Rohextraktlösung + 0,5 mg/ml Hyaluronidase
- ▲ 37,7 mIU/ml Rohextraktlösung + 1 mg/ml Hyaluronidase

(vgl. C. 2. 1. 4. auf Seite 56)

C. 2. 2. Resorption aus Reinsubstanzlösungen
(vgl. B. 6. 1. 2. auf Seite 33 sowie
Abb. 14 und Tab. 8)

Ziel dieser Versuchsreihe war es, herauszufinden, ob die Reinsubstanzen alleine besser resorbiert werden als aus dem Gemisch des Blutegelrohextraktes.
Die graphischen Darstellungen zeigen, daß die Inhibitoren aus der Reinsubstanzlösung besser durch die Haut permeieren (Abb. 14).

Hirudin
Vergleicht man den Kurvenverlauf bei der Rohextraktlösung mit einer Konzentration von 5 mg/ml (entsprechend 12,6 IU/ml) mit dem bei der Reinsubstanzlösung mit einer Konzentration von 7,86 IU/ml, so findet man bis 24 h eine ähnliche Permeationsrate trotz der um den Faktor 1,6 höheren Inhibitorkonzentration im Rohextrakt. Daraus errechnet sich für dieses Zeitintervall eine bessere SHPR für die Reinsubstanzlösung (Rohextrakt: 2,05 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; Reinsubstanz: 4,25 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).
Im Zeitraum von 24 bis 48 h ist die Permeation aus dem Rohextrakt allerdings verbessert, berechnet als SHPR ergibt sich dann ein nahezu gleicher Wert
($SHPR_{Rohextraktlösung}$: 5,8 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$;
$SHPR_{Reinsubstanzlösung}$: 5,9 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).

Eglin
Obwohl die Reinsubstanzlösung nur ein Drittel der Eglinkonzentration der Rohextraktlösung (5 mg/ml) enthielt, war die Hautpermeation gleich gut, d.h. es liegt für die Reinsubstanz eine um den Faktor 3 bessere SHPR vor
($SHPR_{Rohextraktlösung}$: 4,73 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$;
$SHPR_{Reinsubstanzlösung}$: 15,3 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$), und zwar über

	Hautpermeation ($IU \cdot cm^{-2}$*) nach				Standardhatpermeationsrate ($\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach				
	4 h	8 h	24 h	48 h	4 h	8 h	24 h	48 h	24 - 48 h
Rohextrakt-lösung 12,6 IU/ml	0,021	0,073	0,62	2,37	0,42	0,73	2,05	3,92	5,8
Reinsubstanz-lösung 7,86 IU/ml	0,02	nicht gemessen	0,805	1,925	0,63	nicht gemessen	4,25	5,1	6,0

Tab. 8a: Hirudinresorption:
Vergleich der Hautpermeation und Standardhautpermeations-rate (SHPR) aus Rohestraktlösung und Reinsubstanzlösung

*1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22nmol Hirudin

	Hautpermeation ($mIU \cdot cm^{-2}$*) nach				Standardhautpermeationsrate ($\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$) nach				
	4 h	8 h	24 h	48 h	4 h	8 h	24 h	48 h	24 - 48 h
Rohextrakt-lösung 59,4 mIU/ml	-	1,16	10,12	13,48	-	2,44	7,1	4,73	2,36
Reinsubstanz-lösung 75 mIU/ml	-	nicht gemessen	27,5	55	-	nicht gemessen	15,3	15,3	15,3

Tab. 8b: Eglinresorption:
Vergleich der Hautpermeation und Standardhautpermeationsrate (SHPR) aus Rohextraktlösung und Reinsubstanzlösung

*1 mIU entspricht 6,67 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin

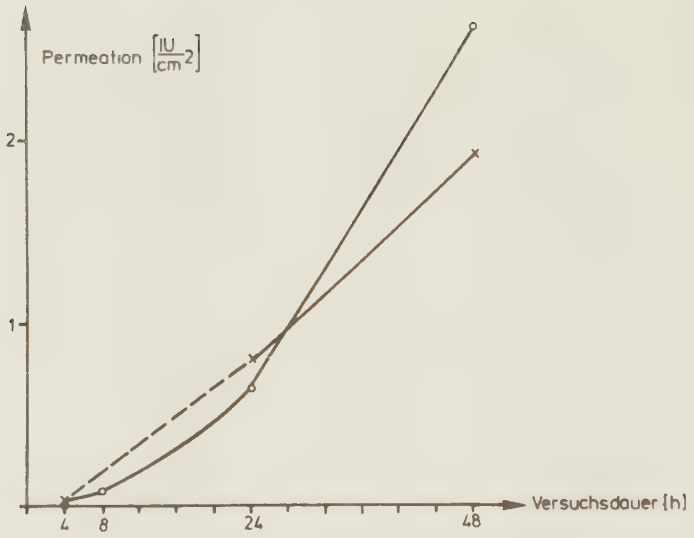

Abb. 14a: Hirudinresorption

Vergleich der zeitabhängigen Hautpermeation aus Rohextrakt- und Reinsubstanzlösung mit einer um den Faktor 1,6 höheren Wirkstoffkonzentration in der Rohextraktlösung

- o Rohextraktlösung (5 mg = 12,6 IU/ml)
- × Reinsubstanzlösung (326 µg = 7,86 IU/ml)

(vgl. C. 2. 2. auf Seite 65)

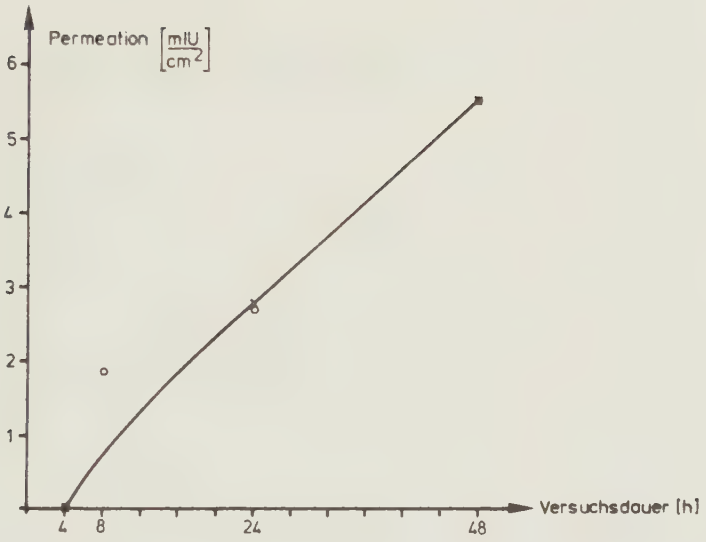

Abb. 14b: Eglinresorption

Vergleich der zeitabhängigen Hautpermeation aus Rohextrakt- und Reinsubstanzlösung mit einer dreifach höheren Wirkstoffkonzentration in der Rohextraktlösung

- ∘ Rohextraktlösung (5 mg = 2,56 IU/ml)
- × Reinsubstanzlösung (50 µg = 0,755 IU/ml)

(vgl. C. 2. 2. auf Seite 65)

die gesamte Versuchsdauer von 48 h. Eglin wird demnach aus der Reinsubstanzlösung wesentlich besser resorbiert als aus der Rohextraktlösung; beim Hirudin ist dagegen kein signifikanter Unterschied meßbar.

C. 3. Resorption von Hirudin und Eglin aus Zubereitungen

C. 3. 1. Gel

(vgl. B. 6. 2. 1. auf Seite 35 sowie Tab. 9)

In dieser Versuchsreihe sollte gezeigt werden, ob die Permeation auch aus galenischen Zubereitungen, wie sie in der Therapie verschiedener Erkrankungen eingesetzt werden, nachweisbar ist.
Verwendet wurde das Exhirud^{R}-Gel mit 500 ATE/g der Fa. Plantorgan.
Da die Hemmaktivitätsmessung aus dem Gel schwierig ist, wurde für die Festlegung der Ausgangsaktivität folgende Berechnung zu Grunde gelegt:
Die Chargen des verwendeten Rohextraktes enthielten konstant 80 ATE/mg. Legt man die Ergebnisse aus der quantitativen Bestimmung der Hirudin-Hemmaktivität im Thrombin/Chromozym TH-Test zu Grunde, so ergibt sich ein Äquivalent von 1 ATE = 31,9 mIU (vgl. Tab. 1a). 2 g Gel enthalten demnach 1000 ATE bzw. 31,9 IU Hirudin. Die Berechnung der Eglinkonzentration im Gel beruht entsprechend auf der quantitativen Bestimmung im Rohextrakt mittels des Chymotrypsin/Suphepa-Tests. 1 mg Rohextrakt (80 ATE) enthält 5,9 mIU Eglin; damit errechnet sich ein Äquivalent von 1 ATE = 0,07 mIU. 2 g Gel ent-

HA* (berechnet) in Kammer I	Molarität Kammer I	HA Kammer II	Molarität Kammer II	HA Kammer II / HA Kammer I	Hautpermeation 0 - 48 h	HPR	SHPR
mIU/2g	µM	mIU/5ml	µM/ml	%	$mIU \cdot cm^{-2}$	$ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	$\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
31900	3,24	115	4,98	0,36	2,9	0,090	3,8
31900	3,24	133	5,76	0,42	3,3	0,104	4,3
31900	3,24	140	6,06	0,44	3,5	0,110	4,6

Tab. 9a: Hirudinresorption:
Hautpermeation, Hautpermeationsrate (HPR) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) nach Applikation von 2 g Gel nach 48 Stunden

*HA = Hemmaktivität

HA* (berechnet) Kammer I	Molarität Kammer I	HA Kammer II	Molarität Kammer II	HA Kammer II / HA Kammer I	Hautpermeation 0 - 48 h	HPR	SHPR
mIU/2g	µM	mIU/5ml	nM	%	$mIU \cdot cm^{-2}$	$ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$	$\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$
73,3	28,4	4,8	0,79	6,5	0,12	16,67	68,0
73,3	28,4	8,2	1,35	11,2	0,2	28,47	114,0
73,3	28,4	4,0	0,66	5,5	0,1	13,89	56,9

Tab. 9b: Eglinresorption:
Hautpermeation, Hautpermeationsrate (HPR) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) nach Applikation von 2 g Gel nach 48 Stunden

*HA = Hemmaktivität

halten demnach 73,3 mIU Eglin (vgl. Tab. 1b).
In Tab. 9a ist die Hirudinhemmaktivität, in Tab. 9b die Eglinhemmaktivität aufgelistet, die nach einer Versuchsdauer von 48 h in der Resorptionslösung gemessen wurde.
Eglin wird aus dem Gel eindeutig besser resorbiert als Hirudin. Die HPR für Hirudin im Zeitraum von 0 bis 48 h beträgt 0,1 $ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bei einer Hirudinkonzentration von 24,2 µg/g Gel. Für Eglin erhält man eine HPR von 19,68 $ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bei einer Eglinkonzentration von 244 µg/g Gel. Obwohl im Gel nur eine 10-fach höhere Konzentration an Eglin vorliegt (Hirudin: 24,2 µg/g, Eglin: 244 µg/g), ergibt sich aber für die HPR ein Verhältnis von 1 : 197.
Aus der Berechnung der konzentrationsunabhängigen SHPR resultieren Werte von 4,23 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ für Hirudin bzw. 79,6 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ für Eglin (vgl. Tab. 11), was einem Verhältnis von 1 : 19 entspricht. Eglin wird demnach aus dem Gel besser resorbiert.

C. 2. 2. Salbe
(vgl. B. 6. 2. 2. auf Seite 35 sowie Tab. 10)

Für die Salbe wurden die Hemmaktivitäten für Hirudin im Thrombin/Chromozym TH-Test und für Eglin im Chymotrypsin/Suphepa-Test entsprechend dem Vorgehen beim Gel berechnet.
Verwendung fand in allen Versuchen die Exhirud^{R}-Salbe der Fa. Plantorgan mit 500 ATE/g entsprechend 15,95 IU/g Hirudin bzw. 36,65 mIU/g Eglin.
Es wurden Versuche mit 1, 2, 5 und 10 g Salbenapplikation durchgeführt. Die Versuche wurden jeweils zweimal wiederholt.

Menge	HA* (ber.) Kammer I	Molarität Kammer I	HA Kammer II	Durchschnittswerte	Molarität Kammer II	HA Kammer II / HA Kammer I	Hautpermeation 0 - 48 h	HPR	SHPR
g	mIU**	µM	mIU/5ml	mIU/5ml	µM/ml	%	mIU·cm^{-2}	ng·cm^{-2}·h^{-1}	µg·cm^{-2}·h^{-1}
1	15950	3,12	150 395 390	312	13,3	1,96	19,5	0,62	25,5
2	31900	3,12	565 478 251	431	18,4	1,35	26,9	0,85	36,1
5	79750	3,12	315 190 822	422	18,0	0,53	26,4	0,83	34,5
10	159500	3,12	460	460	19,6	0,29	28,7	0,91	37,5

Tab. 10a: Hirudinresorption:
Hautpermeation, Hautpermeationsrate (HPR) und Standardhautpermeationsrate (SHPR) nach Applikation von Exhirud-Salbe nach 48 Stunden

** 1 IU entspricht 1,5 µg reinem Hirudin bzw. 0,22 nmol Hirudin

* HA = Hemmaktivität

Menge	HA (ber.) Kammer I	Molarität Kammer I	HA Kammer II	Durchschnittswerte	Molarität Kammer II	HA Kammer II / HA Kammer I	Hautpermeation 0 - 48 h	HPR	SHPR
g	mIU	µM	mIU/5ml	mIU/5ml	µM /ml	%	mIU·cm^{-2}	ng·cm^{-2}·h^{-1}	µg·cm^{-2}·h^{-1}
1	36,65	27,7	12,2 - 31,0	13,3	11,1	36,3	0,83	115	472
2	73,3	27,7	9,2 14,3 11,7	11,7	9,9	16,7	0,73	101	415
5	183,3	27,7	14,7 13,0 6,9	11,5	9,5	6,6	0,72	100	408

Tab. 10b: Eglinresorption:
Hautpermeation, Hautpermeationsrate (HPR) und Standardhaupermeationsrate (SHPR) nach Applikation von Exhirud-Salbe nach 48 Stunden

1 mIU entspricht 667 µg reinem Eglin bzw. 0,82 nmol Eglin
HA = Hemmaktivität

	SHPR ($\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	
	Gel	Salbe
Hirudin	4,23	33,2
Eglin	79,60	432,0

Tab. 11: Vergleich derStandardhautpermeationsrate (SHPR) von Hirudin und Eglin aus unterschiedlichen galenischen Zubereitungen (Gel, Salbe);
(vgl. Tab. 9 und 10)

	SHPR ($\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$)	
	Rohextraktlösung	Reinsubstanzlösung
Hirudin	4,2	5,1
Eglin	5,2	15,3

Tab. 12: Vergleich der Standardhautpermeationsrate (SHPR) von Hirudin und Eglin aus Rohextraktlösung und Reinsubstanzlösung
(vgl. Tab. 2 und 8)

Die Reproduzierbarkeit der Werte in dieser Versuchsreihe ist allerdings sehr schlecht (vgl. Tab. 10).
Wie beim Gel ist auch bei der Salbe die Resorption für Eglin besser als für Hirudin. Die HPR im Zeitintervall von 0 bis 48 h für Hirudin beträgt 0,8 $ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bei einer Konzentration von 242 µg/g Salbe.
Für Eglin erhält man eine HPR von 106 $ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bei einer Konzentration von 244 µg/g. Obwohl in der Salbe nur eine 10-fach höhere Konzentration an Eglin vorliegt (Hirudin: 24,2 µg/g, Eglin: 244 µg/g) ergibt sich aber für die HPR ein Verhältnis von 1 : 132,5.
Aus der Berechnung der konzentrationsunabhängigen SHPR resultieren Werte von 33,4 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ für Hirudin bzw. 432 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ für Eglin, was einem Verhältnis von 1 : 13 entspricht. Eglin wird demnach aus der Salbe besser resorbiert.
Der Wert mit 10 g Salbe wurde für Eglin nicht in Tab. 10 aufgenommen und berücksichtigt, da er wahrscheinlich infolge eines Bestimmungsfehlers nicht verwendbar ist.

D. Diskussion

D. 1. In-vitro-Resorptionsmodelle

In-vitro-Modelle ermöglichen es, die Fähigkeit einer Substanz zu testen, eine vorgegebene Membran unter bestimmten definierten Bedingungen zu penetrieren. Obwohl vieles dafür spricht, daß der Prozeß der Penetration in die Haut ähnlich abläuft wie die Diffusion durch eine

Membran, besteht letztlich doch ein großer Unterschied bezüglich der physikochemischen Eigenschaften isolierter Membranen und eines Gewebes im lebenden Organismus. Letzteres stellt ein viel komplexeres System dar, sowohl in physikalischer als auch in chemischer Hinsicht. So sind die mit in-vitro-Modellen erhaltenen Resultate von der Vorbehandlung der Haut abhängig. Gesteigerte Resorptionsraten finden sich z.B. bei exzidierter Haut, die auf verschiedene Weise enthaart wurde.
Die Ausscheidung von Talg und Schweiß sind physiologische Funktionen der Hornschicht, die im in-vitro-Modell nicht nachgeahmt werden können. Ferner fehlt bei exzidierter Haut der natürliche Feuchtigkeitsgradient, der sicherlich für die Diffusion einer Substanz von großer Bedeutung ist. Weiterhin fehlen die Veränderungen des umgebenden Gewebes, wie z.B. Vasodilatation. Zahlreiche Autoren betonen deshalb die Notwendigkeit großer Zurückhaltung bei der Übertragung von in-vitro-Ergebnissen auf in-vivo-Bedingungen (2, 51, 83, 105).
Als Membranen für in-vitro-Resorptionsversuche werden Agar-Gel, Zellulosefilm, die Schafsblase sowie Tier- und Menschenhaut verwendet. Dabei fand man bei Applikation verschiedener Testsubstanzen, daß die durchschnittliche Hautpermeabilität (z.B. von Äthylenbromid und Paraoxon) Speziesunterschiede aufweist; sie nimmt in folgender Reihenfolge ab: Hase, Ratte, Meerschweinchen, Schwein, Mensch (110).

Für unsere in-vitro-Untersuchungen wählten wir die Schweinehaut, da sie am weitestgehenden die Anforderungen erfüllt, die an ein Modellorgan für die menschliche Haut gestellt werden (4). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben wesentliche histologische Übereinstimmungen in der Struktur der Epidermis von Mensch und Schwein, sowie auch in der Schichtdicke der Haut (44, 45, 66). In der Dermis weist das Schwein einen geringe-

ren Gehalt an elastischen Fasern auf als der Mensch, doch ist dieser immer noch höher als bei anderen Säugetieren (56, 69). Der einzige wesentliche Unterschied zur menschlichen Haut besteht darin, daß das Schwein keine Schweißdrüsen besitzt. Für die Resorptionsversuche ist dies aber unerheblich, da eine Resorption über die Schweißdrüsengänge fraglich ist (vgl. in der Einleitung). In in-vitro-Versuchen erwies sich, daß Schweinehaut gegenüber anorganischen, wäßrigen und organischen Lösungen etwas permeabler ist als menschliche Haut (110). Das mag darauf beruhen, daß die Follikelöffnungen beim Schwein verschiedentlich größer sind und tiefer in das Unterhautfettgewebe reichen (9). Daneben wurden Unterschiede im Resorptionsvermögen verschiedener Hautregionen bei Mensch und Schwein festgestellt. Mittlere Resorptionsraten ergeben sich bei der Entnahme der Haut in der Achselhöhle (11, 51, 101, 115). Basierend auf dieser Erfahrung wurde für alle unsere Versuche Schweinehaut aus der Schenkelbeuge verwendet. Um möglichst natürliche Verhältnisse zu imitieren, wurde als Lösungsmittel für die Substanzen physiologische Kochsalzlösung verwendet. Mit Hilfe eines Phosphatpuffers wurde sie auf einen Blut-pH von 7,4 eingestellt. Nach Möglichkeit wurde bei Körpertemperatur (37°C) gearbeitet.

D. 2. Resorption von Hirudin und Eglin aus Rohextraktlösungen

Hirudin und Eglin sind aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts und ihrer Stabilität gegenüber unspezifischer Proteolyse für Penetrationstudien bestens geeignet.

Die Resorptionsversuche mit Rohextraktlösungen zeigen als wichtigstes qualitatives Ergebnis, daß Hirudin und Eglin unter den gegebenen Versuchsbedingungen als b i o l o g i s c h a k t i v e Inhibitoren durch die isolierte Schweinehaut penetrieren. Bei der quantitativen Beurteilung ergibt sich, daß diese Hautpermeation konzentrationsabhängig ist, d.h., es besteht eine lineare Korrelation zur eingesetzten Rohextrakt- bzw. Inhibitormenge. Daraus folgt, daß die Standardhautpermeationsraten unter den gegebenen Bedingungen konstant sind. Sie betragen für die lineare Resorptionsphase im Zeitraum von 24 bis 48 h für Hirudin 5,2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ und für Eglin ebenfalls 5,2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$. Bei der Betrachtung der Resorptionskurven im Zeitverlauf sieht man eine Verzögerungsphase ohne oder mit geringer Resorption, sodann einen monotonen Anstieg, bis die in der Haut vorhandenen Kompartimente und Hornzellen mit der permeierten Substanz aufgefüllt sind. Erst wenn die Diffusion und Verteilung in der Haut abgeschlossen ist, kann bei ausreichendem Konzentrationsgefälle zwischen der Aussenseite der Haut und dem aufnehmendem Medium ein Durchtritt der Substanz gemessen werden. Der maximale Substanzfluß wird jedoch erst unter steady-state-Bedingungen erreicht (74).

Um die Resorptionsraten beider Inhibitoren besser vergleichen zu können, wurden die Molaritäten der Lösungen in den Kammern I und II berechnet (ein Berechnungsbeispiel findet sich im Anhang). Daraus ergibt sich, daß die molare Konzentration an Eglin im Rohextrakt um den Faktor 7,8 größer ist als an Hirudin (Hirudin: 2,7 - 5,34 μM; Eglin: 21 - 48,9 μM). Da die HPR konzentrationsabhängig ist, liegt dieser Wert für Eglin entsprechend höher.

Die Werte der konzentrationsunabhängigen SHPR sind für beide Inhibitoren annähernd gleich, d.h., Hirudin und Eglin werden aus dem Rohextrakt in etwa gleich gut re-

sorbiert ($SHPR_{Hirudin}$: 4,2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: 4,8 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).
Wie schon in der Einleitung erwähnt, hat die Hauttemperatur einen entscheidenden Einfluß auf die perkutane Resorption.
Die günstigste Penetrationsrate liegt für beide Inhibitoren bei 37°C, also bei Körpertemperatur. Sowohl für Hirudin als auch für Eglin findet sich die niedrigste Durchtrittsrate bei 21°C, die bei 29°C leicht ansteigt und dann bei 37°C das Optimum erreicht. Es ist wahrscheinlich, daß mit einem weiteren Anstieg der Temperatur auch die Resorptionsrate noch ansteigt.

D. 3. Resorption von Hirudin und Eglin aus Reinsubstanzlösungen

In dieser Versuchsreihe fällt auf, daß Hirudin und Eglin ein unterschiedliches Resorptionsverhalten aufweisen. Hirudin penetriert im Zeitintervall von 0 - 24 h besser aus Reinhirudinlösungen als aus der Rohextraktlösung ($HPR_{Reinhirudinlösung}$: 4,25 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $HPR_{Rohextraktlösung}$: 2,05 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).
Danach ist die Resorption aus der Rohextraktlösung etwas verbessert. Bestimmt man die SHPR für diese Versuchsreihe über den gesamten Versuchszeitraum von 0 - 48 h, so beträgt sie für die Rohextraktlösung 3,92 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ und für die Reinsubstanzlösung 5,1 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$. Im linearen Bereich zwischen 24 und 48 h Versuchsdauer ist die Permeationsrate für Hirudin aus Rohextrakt- bzw. Reinsubstanzlösung vergleichbar. Die Ursache dafür könnten sowohl in der Zusammensetzung des Rohextraktes liegen (z.B. auf einer Assoziation des Hirudins an andere, basische Polypeptide beruhen), als

auch in einer Assoziationsneigung von Hirudin in proteinfreien Lösungen. Sie können aber auch auf ionischen Wechselwirkungen des unter den verwendeten Bedingungen negativ geladenen Hirudins mit der negativ geladenen Hautmatrix beruhen.

Eglin wird aus der Reinsubstanzlösung leichter resorbiert als aus der Rohextraktlösung. Es errechnet sich eine SHPR von 4,73 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ für die Rohextraktlösung gegenüber einer SHPR von 15,3 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ für die Reinsubstanzlösung. Die SHPR liegt damit für die Reinsubstanzlösung um den Faktor 3 höher.

Die zahlreichen Begleitproteine des Rohextraktes könnten zur Kompetition ähnlich geladener Moleküle in den transepidermalen und transfollikulären Absorptionswegen führen, wodurch sich die Resorption aus dem Stoffgemisch verschlechtert (geringere Aufnahme in die Haut aufgrund der gegebenen Konkurrenzsituation), d.h. verschiedene Substanzen konkurrieren um die gleichen Resorptionswege. In den Versuchen mit Reinsubstanzen ließ sich weder für Hirudin noch für Eglin eine Sättigung erreichen. Die Sättigungskonzentration scheint aber für Reinsubstanzlösungen höher zu liegen als für Rohextraktlösung (vgl. oben). Die Sättigung ist aber möglicherweise in den Zellen und im Interzellularraum des Stratum corneum erreicht. Aus diesen Depots können die Inhibitoren kontinuierlich in kleinen Mengen an das aufnehmende Medium abgegeben werden (62).

D. 4. Resorption von Hirudin und Eglin in Gegenwart von Zusätzen

D. 4. 1. Hyaluronidase

Hyaluronidase ist das depolymerisierende Enzym der Hyaluronsäure, einem wichtigen Bestandteil der Grundsubstanz der Haut. Das Enzym vermindert rasch die Viskosität einer wäßrigen Hyaluronsäurelösung. Wird einer subcutanen Infusion Hyaluronidase zugesetzt, so wird durch Spaltung der Bindegewebshyaluronsäure die Struktur des Bindegewebes aufgelockert und die Resorption somit erleichtert (35).
Hyaluronidase erhöht die Permeationsrate einer NaCl-Lösung auf das 10-fache, ein Vorgang, der durch makromolekulare Stoffe gestoppt werden kann (10).
Die SHPR im Zeitraum von 0 - 48 h steigt für Hirudin von 3,57 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ ohne Zusatz auf 5,17 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bei Hyaluronidasezusatz an; das bedeutet eine Steigerung um den Faktor 1,45 (vgl. Tab. 7a).
Für Eglin steigt die SHPR im selben Zeitintervall von 4,94 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ auf 8,03 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bei Hyaluronidasezusatz an. Daraus errechnet sich ein Faktor von 1,63 (vgl. Tab. 7b). Eglin wird demnach nach dem Zusatz von Hyaluronidase in sehr viel stärkerem Maße resorbiert als Hirudin.
Interessanterweise zeigt sich eine in ihrem Ausmaße überraschende Konzentrationsabhängigkeit der Resorption. Wird die Hyaluronidasekonzentration auf 1 mg/ml verdoppelt, so bewirkt man keine weitere Resorptionssteigerung: Für die SHPR erhält man dann den gleichen Wert wie ohne Zusatz bzw. nimmt sie sogar geringfügig ab.

Bereits mit 0,5 mg/ml Hyaluronidase scheint eine "kritische" Konzentration erreicht zu sein, von der ab eine Steigerung der Resorption nicht mehr möglich ist.

D. 4. 2. Kallikrein und Kinine

Weitere Versuche zur Steigerung der Permeationsrate wurden mit Gewebskallikrein und Bradykinin durchgeführt, zwei Komponenten des Kallikrein/Kinin-Systems. Im lebenden Organismus setzt das Enzym Kallikrein aus dem natürlichen Substrat Kininogen Kinine frei (Abb. 15) (27).
Kinine, die physiologisch wirksamen Effektoren dieses enzymatischen Regulationssystems, bewirken u.a. eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Um diese Kininwirkungen zeitlich und räumlich zu begrenzen, kommen im Organismus ubiquitär Kininasen vor, d.s. kininabbauende Enzyme. In hoher Konzentration findet sich Kininase I in der Haut, Kininase II im Gewebe.
In den vorliegenden Versuchen konnte eine signifikante Steigerung der Permeationsrate weder durch das Kallikrein noch durch das Kinin erzielt werden.
U.U. ist es auf die Wirkung der Kininasen zurückzuführen, daß die Versuche mit Bradykinin und Kallikrein negativ verliefen. Zum anderen ist ihre Wirkungsweise wahrscheinlich von einem intakten Kapillarsystem abhängig, wodurch Resorptionsversuche mit diesen Substanzen in-vitro ohne Effekt sind, jedoch in in-vivo-Experimenten durchaus sinnvoll sein könnten.

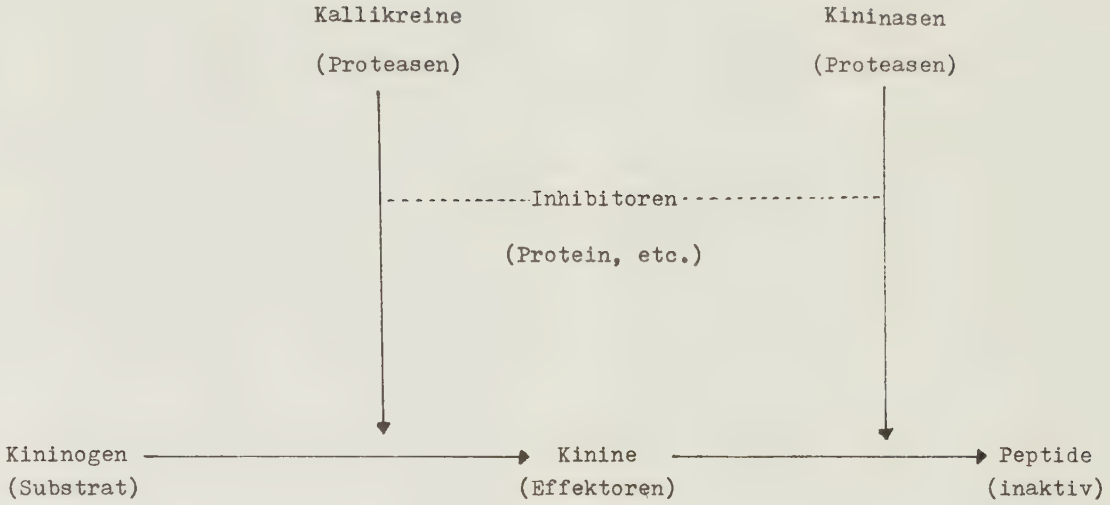

Abb. 15: Die einzelnen Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems und ihre Interaktionen (27)

D. 5. Resorption von Hirudin und Eglin aus Zubereitungen

Gele stellen ein elastisches System dar, das aus einem zusammenhängenden, dreidimensionalen Netzwerk besteht. Die Stabilisierung erfolgt durch elektrostatische Brücken, Dipol-Dipol-Interaktionen und Wasserstoffbrücken. Dieses komplexe Trägersystem hat im Vergleich zum leicht verformbaren System der Salbe erhebliche Schwierigkeiten beim Eindringen in eine biologische Membran (104).
Da die beiden Inhibitoren in dieses komplexe Gebilde eingearbeitet sind, erschwert sich für sie offensichtlich die Permeation.
Aus den vorliegenden experimentellen Ergebnissen (s.S. 70) ist ersichtlich, daß nach Gelapplikation beide Inhibitoren die Schweinehaut permeieren. Eglin permeiert besser als Hirudin. Beim Vergleich der SHPR ergibt sich ein Unterschied um den Faktor 19 ($SHPR_{Hirudin}$: 4,2 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: 79,6 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; vgl. Tab. 9a und b).

Die Reproduzierbarkeit der Werte in der Salbenversuchsreihe ist schlecht. Dies mag in gewisser Weise der Membran, also der Schweinehaut, zuzuschreiben sein. U.U. hat die Vorbehandlung der Haut im Schlachthof (Brühen, Rasieren) einen entscheidenden Einfluß auf die Permeationsrate, wie schon in der Einleitung ausgeführt wurde. Außerdem ist die Anzahl der Haarfollikel und Talgdrüsen von Haut zu Haut verschieden. Speziell in dieser Versuchsreihe kommt noch ein weiterer Faktor hinzu. Je nach dem beim Einmassieren der Salbe aufgewendeten Druck können unterschiedliche Mengen an Salbe und damit auch an Blutegelwirkstoffen in die Haut gelangen.
Bei den Salbenversuchen zeigt sich erneut, daß Eglin besser resorbiert wird als Hirudin. Beim Vergleich der SHPR ergibt sich ein Faktor von 13 ($SHPR_{Hirudin}$:

33,15 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: 432 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; vgl. Tab. 10a und b).
Wir erwarteten ursprünglich in dieser Versuchsreihe eine Steigerung der Resorption durch Applikation steigender Salbenmengen. Da sich aber nur das aufgebrachte Volumen erhöhte, die Konzentration der Blutegelwirkstoffe in der Salbe aber immer die gleiche war, erhöhte sich die Resorption offensichtlich nicht, da sich auch der maximale Substanzfluß nicht ändern konnte. Hier wäre es günstiger gewesen, Salben mit unterschiedlicher Konzentration an Blutegelwirkstoffen zu testen.

Beim Vergleich von Salbe und Gel zeigt sich, daß die Resorptionsraten aus dem Gel erheblich niedriger liegen als aus der Salbe, und zwar für Hirudin um den Faktor 7,8 und für Eglin um den Faktor 5,4 ($SHPR_{Hirudin}$: aus Gel 4,2 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ und aus Salbe 33,15 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: aus Gel 79,6 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ und aus Salbe 432 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; vgl. Tab. 11).

Vergleicht man die SHPR-Werte für Salbe und Rohextraktlösungen, so ergibt sich für Hirudin eine bessere Resorption aus Rohextraktlösung um den Faktor 127, für Eglin um den Faktor 12 ($SHPR_{Hirudin}$: aus Rohextrakt 4,2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ und aus Salbe 33,15 $nl \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: aus Rohextrakt 5,2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ und aus Salbe 432 $nl \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; vgl. Tab. 14 und 15).
In einer anderen Arbeitsgruppe wurden Resorptionsversuche von Hirudin aus Salbe durchgeführt. Dabei ergab sich eine SHPR von 22 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ (74). In den vorliegenden Versuchen liegt dieser Wert bei 33,15 $\mu g \cdot cm^{-2}, h^{-1}$. Der höhere Wert bei unseren Versuchen beruht evt. in der Verwendung eines offenen Systems. Die durch die Schwei-

nehaut permeierten Inhibitoren konnten sich nur in der physiologischen Kochsalzlösung der Kammer II verteilen. Im geschlossenen System der betreffenden Arbeitsgruppe konnten sich die Blutegelwirkstoffe dagegen in den verschiedenen Kompartimenten (Gewebe, Blut, parenchymatösen Organen) verteilen.

E. Zusammenfassung

Die Blutegelwirkstoffe Hirudin und Eglin permeieren durch die isolierte Schweinehaut als b i o l o g i s c h a k t i v e Inhibitoren.
Die Permeation aus der Rohextraktlösung ist konzentrationsabhängig und temperaturabhängig.
Aus den vorliegenden Ergebnissen berechnet sich für Hirudin eine Hautpermeationsrate von 118 $ng \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ entsprechend einer Standardhautpermeationsrate von 4,2 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$. Für Eglin ergibt sich eine Hautpermeationsrate von 1,3 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ bei einer Standardhautpermeationsrate von 4,8 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$.
Unter den gewählten Bedingungen wurde sowohl für Hirudin als auch für Eglin die günstigste Permeationsrate bei 37°C erreicht.
Der Zusatz von Bradykinin und Kallikrein hatte keinen signifikanten Anstieg der HPR zur Folge.
Jedoch erhöhte sich die Permeation von Hirudin und Eglin aus der Rohextraktlösung nach Zusatz von Hyaluronidase in einer Konzentration von 0,5 mg/ml:
Die SHPR steigt für Hirudin von 3,57 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ (ohne Zusatz) auf 5,17 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; für Eglin ergibt sich eine Steigerung von 4,94 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$ auf 8,03 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$.

Nach Zusatz von 1 mg/ml Hyaluronidase verzeichnet man keinen weiteren Anstieg.

Aus der Reinsubstanzlösung wird Hirudin nicht besser resorbiert als aus der Rohextraktlösung. Die Standardhautpermeationsraten sind für beide Lösungen annähernd gleich ($SHPR_{Rohextraktlösung}$: 5,8 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Reinsubstanzlösung}$: 5,9 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$). Für Eglin ergibt sich eine um den Faktor 3 bessere Resorption aus der Reinsubstanzlösung verglichen mit der Resorptionsrate aus der Rohextraktlösung ($SHPR_{Rohextraktlösung}$: 4,73 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Reinsubstanzlösung}$: 15,3 $\mu l \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).

Die Permeation der Inhibitoren aus Zubereitungen ergibt schlecht reproduzierbare Werte. Insgesamt werden Hirudin und Eglin aus Salbe besser resorbiert als aus Gel ($SHPR_{Hirudin}$: aus Gel 4,23 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$, aus Salbe 33,2 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: aus Gel 79,6 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$, aus Salbe 432 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).

Bei der Berechnung der Standardhautpermeationsraten aus den Gelversuchen ergibt sich ein Resorptionsverhältnis Hirudin : Eglin von 1 : 19 ($SHPR_{Hirudin}$: 4,23 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: 79,6 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$), d.h. Eglin wird besser resorbiert als Hirudin.

Ein ähnliches Ergebnis findet sich für die Standardhautpermeationsrate aus den Salbenversuchen: das Verhältnis Hirudin : Eglin beträgt hier 1 : 13 ($SHPR_{Hirudin}$: 33,4 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$; $SHPR_{Eglin}$: 432 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$).

Obwohl die in dem verwendeten in-vitro-Modell erzielten Resultate nur bedingt auf die in-vivo-Situation übertragbar sind, sprechen sie für eine allgemeine Hautgängigkeit der Blutegelwirkstoffe Hirudin und Eglin.

Anhang: Wichtige Umrechnungsfaktoren

1) Umrechnung der Hemmaktivität in mIU von Hirudin und Eglin auf mg bzw. µg

   a) Hirudin (Molekulargewicht: 7043)

      660 mIU = 1 µg = 0,142 nmol

      Beispiel Gel:

      31.900 mIU entsprechen dann 48,3 µg = 6,86 nmol

      vgl. Tab. 3

   b) Eglin (Molekulargewicht: 8100)

      150 mIU = 1 mg = 123,5 nmol

      Beispiel Gel:

      73,3 mIU entsprechen dann 489 µg = 60,4 nmol

      vgl. Tab. 4

2) Berechnung der HPR:

$$HPR = \frac{\text{Hemmaktivität in Kammer II}}{cm^2 \cdot h}$$

Beispiel Hirudin: (Rohextraktlösung 5 mg/ml, vgl. Tab.2)

$$HPR = \frac{94}{40 \cdot 48} = 0{,}049 \text{ IU} \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$$

3) Berechnung der SHPR:

$$SHPR = \frac{HPR}{c}$$

Beispiel Hirudin: (Rohextraktlösung 5 mg/ml, vgl. Tab. 2)

$$SHPR = \frac{0{,}049}{1245} = 3{,}9 \text{ µl} \cdot cm^{-2} \cdot h^{-1}$$

Literaturverzeichnis

1 Allenby, A.C., Creasey, N.H., Edginton, J.A.G., Fletcher, J.A., Schock, C.
Mechanism of action of accelerants on skin penetration
Br. J. Derm. (Suppl. 4), 81, 1969, S. 47 - 55

2 Barnes, J.M.
Percutaneous Toxicity
in Boyland and Goulding Modern trends in toxicology
Butterworth, London, 1968, S. 18 - 38

3 Barr, M.
Percutaneous Absorption
J. pharm. Sci. 51, 1962, S. 395 - 409

4 Bartek, J., La Budde, J.A., Maibach, H.J.
Skin permeability in vivo: Comparison in Rat, Rabbit, Pig and Man
J. invest. Derm. 1972, 58, 3, S. 114 - 123

5 Blank, J.H., Griesemer, R.D., Gould, E.
The penetration of an anticholinesterase agent (sarin) into skin, I. Rate of penetration into excised human skin
J. invest. Derm. 29, 1957, S. 299

6 Blank, J.H.
The epidermal barrier
J. Soc. Cosm. Chem. 11, 1960, S. 59 - 65

7 Blank, J.H., Scheuplein, R.J.
Transport into and within the skin
Brit. J. Derm. 81, suppl. 4, 1969, S. 4 - 10

8 Bliss, A.R.
The absorption of certain drugs from the human skin
Brit. J. Derm. 25, 1936, S. 694 - 701

9 Borelli, S., Metzger, M.
Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen über die perkutane Penetration fluoreszierender Stoffe
Hautarzt 8, 1957, S. 261 - 266

10 Cameron, E.
Hyaluronidase and Cancer
Pergamon Press Oxford, London, 1966

11 Cronin, E., Stoughton, R.B.
Percutaneous Absorption
Regional variations and the effect of hydration and epidermal stripping
Brit. J. Derm. 74, 1962, S. 265 - 272

12 Dann, G.E.
Einführung in die Pharmaziegeschichte
Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart

13 Del Mar, E.G., Largman, C., Brodrick, J.W., Geokas, M.C.
A Sensitive New Substrate For Chymotrypsin
Anal. Biochem. 99, 1979, S. 316 - 320

14 Deuser, E.
Über Behandlungsmethoden von Distorsionen, Kontusionen, Hämatomen im Sportgeschehen
Sportarzt und Sportmedizin, 5, 1971, S. 112 - 113

15 DFG-Nachrichten Jahresbericht
Mainzer Hygieneinstitut

16 Dodt, J
persönliche Mitteilung

17 Downing, D.T., Strauss, J.S.
Synthesis and composition of surface lipids of human skin
J. invest. Derm. 62, 1974, S. 228

18 Duckert, F.
Die Anwendung chromogener Substrate in der Gerinnungsanalytik
Aktuelle Diagnostik, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

19 Eder, M., Gedigk, P.
Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie
Springer Verlag Berlin, 1977, S. 723

20 Elias, P.M., Goerke, J., Friend, D.S.
Mammalian epidermal barrier layer lipids;
Composition and influence of structure
J. invest. Derm., 69, 1977, S. 535

21 Feldman, P.M., Maibach, H.J.
Penetration of ^{14}C hydrocortisone through normal skin
Archs. Derm. 91, 1965, S. 661

22 Feldman, R.J., Maibach, H.J.
Regional variation in percutaneous penetration of ^{14}C cortisol in man
J. invest. Derm. 48, 1967, S. 181

23 Folin, O., Ciocalteu, V.
A new, sensitive method to measure proteins
J. Biol. Chem. 73, 1927, S. 627

24 Fredriksson, T.
Influence of solvents and surface active agents on the barrier function of the skin towards sarin
II. Increase in rate of absorption
Acta derm.-vener. 49, 1969, S. 55 - 58

25 Fritsch, W.C., Stoughton, R.B.
The effect of Temperature and Humidity an the Penetration of 14-Acetylsalicylic acid in excised human Skin
J. invest. Derm. 41, 1963, S. 307

26 Fritz, H., Gebhardt, M., Meister, R., Fink, E.
in: Proceedings of the international research conference on proteinase inhibitors Munich 1970
Trypsin-Plasmin-Inhibitors from Leeches
Isolation, Amino Acid Composition, Inhibitory Characteristics
Walter de Gruyter, Berlin, S. 271 - 280

27 Fritz, H.
Biochemische Aspekte einer Kallikreinanwendung
Fortschritte der Andrologie 6, S. 6 - 15
Grosse Verlag 1978

28 Fritz, H.
Proteinase inhibitors in severe inflammatory processes (septic shock and experimental endotoxaemia) biochemical, pathophysiological and therapeutic aspects
Excerpta Medica 1980, S. 351 - 256

29 Frost, P., Weinstein, G.
Topical vitamin acid for scaling dermatoses
Clin. Res. 16, 1968, S. 255 - 256

30 Gloor, M.
Lipide der Hautoberfläche - über die Beziehung zwischen Stratum corneum - Lipiden und Funktion und Morphe des normalen Stratum corneum
in Stratum corneum von F. Kaschka
Grosse Verlag Berlin, S. 77 - 81

31 Goldstein, J.M.
in Mediators of Inflammation (Weissmann, G. ed.)
Plenum Press New York, 1974, S. 51 - 84

32 Gollnick, N.
Zur Behandlung des Status varicosus
Die med. Welt Nr. 47, 1963, S. 2417 - 2420

33 Grice, K.A.
Transepidermal Water Loss
in The Physiology and Pathophysiology of the Skin
by A. Jarrett
Academic Press New York, 1980

34 Hadgraft, J.W., Somers, G.F.
Percutaneous absorption
J. Pharm. Pharmacol. 8, 1956, S. 625 - 634

35 Harper, H., Löffler, G., Petrides, P., Weiss, L.
Physiologische Chemie
Springer Verlag Berlin, 1975

36 Harris, D.R., Papa, C.M., Stanton, R.
Percutaneous absorption and the surface area of occluded skin
Br. J. Derm., 91, 1974, S. 27 - 32

37 Haustein, K.O., Markwardt, F.
Über den Einfluß von Hemmstoffen der Blutgerinnung und Fibrinolyse auf das Sanarell -Shwarzman-Phänomen
Thrombos. Diathes. haemorrhag. 13, S. 60

38 Haycraft, J.B.
Über die Einwirkung eines Sekretes des offizinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 18, 1884, S. 209

39 Herrmann, F.
Introduction of allergens into the skin by inunction with intraderm
Ann. Allergy 3, 1945, S. 431 - 434

40 Higuchi, T.
Design of chemical structure for optimal dermal delivery
J. Soc. Cosmetic. Chemists 11, 1960, S. 85

41 Idson, B.
Percutaneous absorption
J. Pharm. Sci. 64, 1975, S. 901

42 Jäcker, G., Kemper, F.H., Lüpke, N.P., Rusche, C.
Über den Einfluß von Depilation, Hautvorbehandlung und Lösungsmitteln auf die kutane Resorption
Ärztl. Kosmet. 1975, 1975, S. 178 - 184

43 Janoff, A., Blondin, J., Sanhaus, R.A., Mosser, A. and Malemud, C.
in Proteases and Biological Control
(Reich, E., Fikin, D.B. and Shaw, E., eds.)
S. 603 - 620
Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor 1975

44 Karasek, J. und Oehlert, W.
Die Ultrastruktur der Epidermis des Schweines, Stratum basale und Stratum spinosum
Z. mikrosk.-anat. Forsch. 78, 1967, S. 157 - 169

45 Karasek, J. und Oehlert, W.
Die Ultrastruktur der Schweineepidermis
Stratum granulosum und corneum
Z. mikrosk.-anat. Forsch. 79, 1968, S. 157 - 169

46 Kligmann, A.M.
The biology of the stratum corneum
in Montagna and Lobitz: The epidermis
Academic Press New York, 1964

47 Krejci, K., Fritz, H.
Structural homology of a Trypsin-Plasmin-Inhibitor
from Leeches (Bdellin B_3) with secretory Trypsin
Inhibitors from Mammals
in FEBS Lett. 64, 1976, S. 152 - 155

48 Laug, E.P., Vos, E.A., Kunze, F.M. and Umberger, E.J.
A method for the determination of cutaneous pene-
tration of mercury
J. Pahrmacol. Exptl. Therp. 89, 1947, S. 42

49 La Wall, C.H.
Four Thousand Years of Pharmacy
J.P. Lippincott Co., Philadelphia, Pa., 1927

50 Leonhardt, H.
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen
Georg Thième Verlag Stuttgart, 1974, S. 285

51 Lindsey, D.
Percutaneous penetration
12th int. Congr. of Dermatology Washington, D.c. 1962

52 Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall,
R.J.
Protein measurement with the Folin Phenol Reagent
J. Biol. Chem. 193, 1951, S. 265

53 Mac Kee, G.M., Sulzberger, M.B., Herrmann, F. and Baer, R.L.
Histologic Studies on Percutaneous Penetration with special Reference to the Effect of Vehicles
J. invest. Derm., 6, 1945, S. 43 - 62

54 Maibach, H.I., Feldmann, R.J.
The effect of DMSO on percutaneous penetration of hydrocortisone and testosterone in man
Ann. N.Y., Acad. Sci. 141, 1967, S. 423 - 427

55 Mali, J.W.H.
The transport of water through the human epidermis
J. invest. Derm. 27, 1956, S. 451 - 469

56 Marcarian, H. and Calhoun, M.L.
Microscopic anatomy of the integument of the swine
Am. J. vet. Res. 27, 1966, S. 765 - 772

57 Markwardt, F.
Untersuchung über Hirudin
Naturwissenschaften 42, 1955, S. 537

58 Markwardt, F.
Die antagonistische Wirkung des Hirudins gegen Thrombin in vivo
Naturwissenschaften 43, 1956, S. 111

59 Markwardt, F.
Untersuchungen über den Mechanismus der blutgerinnungshemmenden Wirkung des Hirudins
Z. exp. Path. und Pharmakol., 229, 1956, S. 389 - 399

60 Markwardt, F.
Versuche zur pharmakolog. Charakterisierung des Hirudins

Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. und Pharmak. 234, 1958, S. 516 - 529

61 Markwardt, F., Walsmann, P.
Die Reaktion zwischen Hirudin und Thrombin
Hoppe-Seylers'Z. physiol. Chem. 312, 1958, S. 85 -98

62 Markwardt, F.
Bluterinnungshemmende Wirkstoffe aus blutsaugenden Tieren
VEB Gustav Fischer Verlag Jena, 1963

63 Markwardt, F., Landmann, H.
in Markwardt, F.:
Handbuch der experimentellen Pharmakologie, Bd. 27:
Anticoagulantien, S. 76
Springer Verlag Berlin, 1971

64 McKenzie, A.W.,
Percutaneous Absorption of Steroids
Archs. Derm. 86, 1962, S. 611

65 McKenzie, A.W., Stoughton, R.B.
Method for comparing percutaneous absorption of steroids
Archs. Derm., 86, 1962, S. 608

66 Meyer, W., Schwarz, R. and Neuran, K.
The skin of domestic mammals as a model for the human skin, with special reference to the domestic pig
Curr. Probl. Derm., Vol. 7, S. 39 - 52
Karger Basel, 1978

67 Mizuchi, A., Miyachi, Y., Tamaki, K., Kukita, A.
Percutaneous absorption of betamethasone-17-benzoate measured by radioimmunoassay
J. invest. Derm. 67, 1976, S. 279 - 282

68 Montagna, W.
Penetration and local effect of vitamin A on the skin of the guinea pig
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 86, 1954, S. 668 - 672

69 Montagna, W. and Yun, J.S.
The skin of the domestic pig
J. invest. Derm. 43, 1964

70 Orfanos, C.E.
Aufbau der Hornschicht im Hinblick auf ihre Funktion
in Stratum corneum von F. Klaschka
Grosse Verlag Berlin, S. 29 - 47

71 Ostrenga, G.H., Steinmetz, C. und Poulsen, B.
Significance of vehicle composition I:
Relationship between topical vehicle composition, skin penetrability and clinical efficacy
J. pharmac. Sci. 60, 1971, S. 1175 - 1179

72 Petersen, T.E., Roberts, H.R., Sottrup-Jensen, L., Magnusson, S., Bagdy, D.
Primary structure of hirudin, a thrombin-specific inhibitor
in H. Peeter, Protides of the Biological Fluids,
Bd. 23, S. 145 - 149,
Pergamon Press London, 1976

73 Pratzel, H.
Begriffe und Benennungen zum perkutanen Stofftransport
in Vorbereitung

74 Pratzel, H.
Perkutane Resorption von Hirudin
in Vorbereitung

75 Pratzel, H.
persönliche Mitteilung

76 Prottey, G.
Investigation of functions of essential fatty acids in the skin
Br. J. Derm. 97, 1977, S. 29

77 Rein, H.
Experimentelle Studien über Elektronendosmose an überlebender menschlicher Haut
Z. Biol. 81, 1924, S. 125

78 Rick, W.
Klinische Chemie und Mikroskopie
Springer Verlag Berlin, 1977, S. 96

79 Ringshausen, D..
Ein Beitrag zur Behandlung von Erfrierungen
Medizin heute, Heft 8, 1963, S. 398 - 400

80 Rothman, S.
Physiology and biochemistry of the skin
Chicago University Press, Chicago, 1954, S. 26 - 59

81 Rushmer, R.F.K., Buettner, J.K., Odland, G.F.
The skin
Science 154, 1966, S. 343 - 348

82 Schaefer, H.
Stratum corneum: Funktion als Grenzmembran
Stratum corneum von F. Klaschka
Grosse Verlag Berlin

83 Schaefer, H., Zesch, A., Stüttgen, G.
Skin Permeability
Springer Verlag Berlin, 1982

84 Scheuplein, R.J.
Mechanism of percutaneous absorption
I. Routes of penetration and the influence of solubility
J. invest. Derm. 45, 1965, S. 334 - 346

85 Scheuplein, R.J.
Mechanism of percutaneous absorption
II. Transient diffusion and the relative importance of various routes of skin penetration
J. invest. Derm. 48, 1967, S. 79

86 Scheuplein, R.J., Ross, L.W.
Mechanism of percutaneous absorption
V. Percutaneous absorption of solvent deposited solids
J. invest. Derm. 62, 1974, S. 353 - 360

87 Scheuplein, R.J.
The skin as a barrier
in The Physiology and Pathophysiology of the Skin
by A. Jarrett, V5
Academic Press, New York, 1978

88 Schiessler, H., Hochstrasser, K., Ohlsson, K.
Acid-Stable Inhibitors of Granulocyte Neutral Proteases in Human Mucous Secretions:
Biochemistry and Possible Biological Function
Urban & Schwarzenberg, Baltimore-München, 1978,
S. 195 - 207

89 Schramm, W., Gröschel, G., Segerer, W., Marx, R.
in R. Marx und H.A. Thies
Niere, Blutgerinnung und Hämostase
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart, 1978, S. 299

90 Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H.P., Fritz, H.
Isolation and Characterisation of low molecular weight inhibitor from Leeches
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd. 358, 1977, S. 1105 - 1117

91 Seemüller, U.
Inhibitoren aus dem Blutegel Hirudo Medicinalis mit Hemmwirkung gegen Chymotrypsin, Subtilisin und die menschl. Granulocytenproteinasen Elastase und Kathepsin G
Dissertationsarbeit, München, 1979

92 Shelley, W.B., Melton, F.M.
Studies on absorption through normal human skin
Federation Proc. 6, 1947, S. 199 - 200

93 Shelmire, J.B.
Observations on the role of vehicles in percutaneous penetration
Arch. Derm. Chicago 78, 1958, S. 191 - 195

94 Shelmire, J.B.
Factors determining the skin-drug-vehicle relationship
Arch. Derm. 82, 1960, S. 78 - 85

95 Skog, E., Wahlberg, J.E.
Effect of dimethyl sulfoxide on skin; a macroscopic and microscopic investigation on human skin
Acta derm. vener. (Stockholm) 47, 1967, S. 426 - 434

96 Sobotta, Hammersen
Atlas der Histologie des Menschen
Urban & Schwarzenberg, München, 1975, S. 158 - 159

97 Solomon, A. Schmidt, W., Havemann, K.
Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral proteases derived from human granulocytes on Bence Jones proteins
J. Immunol. 117, 1976, S. 1010 - 1014

98 Stock, D., Diezemann, E., Ell, N. und Gollstein, J.
Bringt die lokale Blutegelwirkstoffapplikation in Salbenform Vorteile für die Mobilisierung operierter Gelenke?
Therapiewoche 29, 1979, S. 2626 - 2632

99 Stoughton, R.B., Fritsch, W.
Influence of dimethyl sulfoxide on human percutaneous absorption
Archs. Derm. 90, 1964, S. 512

100 Strakosch, E.A., Clark, W.G.
Studies on the penetration of sulfonamides into the skin
Am. J. Med. Sci. 205, 1943, S. 610

101 Stüttgen, G., Betzler, H.
Zur Frage der Permeation von Elektrolyten durch die Haut
II. In-vitro- und in-vivo-Versuche an menschl. Haut mit $^{45}Ca^{2+}$
Arch. klin. exp. Derm. 204, 1957, S. 165 - 175

102 Stüttgen, G.
Die normale und patholog. Physiologie der Haut
Fischer Verlag Stuttgart, 1965, S. 314 - 336

103 Stüttgen, G.
Die Haut als Resorptionsorgan in pharmakokinet. Sicht
Arzneimittelforschung 22, 1972, S. 324 - 329

104 Stüttgen, G., Schaefer, H.
Funktionelle Dermatologie
Springer Verlag Berlin, 1974

105 Sulzberger, M.B.
In discussing a paper by Fritsch, W.C. and Stoughton, R.B.
The effect of temperature and humidity on the penetration of C^{14}- acetylsalicylic acid in excised human skin
J. invest. Derm. 41, 1963, S. 310 - 311

106 Svendsen, L.
Aktivitätsbestimmung proteolyt. Enzyme mit synthetischen Substraten
in Aktuelle Diagnostik, Boehringer Mannheim

107 Szakall, A.
Experimentelle: Daten zur Klärung der Funktion der Wasserbarriere in der Epidermis des lebenden Menschen
Berufsdermatosen 6, 1958, S. 171

108 Tregear, R.T.
Relative penetrability of hair follicles and epidermis
J. Physiol., Lon. 156, 1961, S. 307 - 313

109 Tregear, R.T.
Physical functions of skin
Academic Press, Inc., New York, 1966

110 Tregear, R.T.
The permeability of mammalian skin to ions
J. invest. Derm. 46, 1966, S. 16

111 Treherne, J.E.
The permeability of skin to some non-electrolytes
J. Physiol., Lond. 133, 1956, S. 171 - 180

112 Triebel, H., Walsmann, P.
Die Bestimmung des Molekulargewichts von Hirudin in der Ultrazentrifuge
Biochem. biophysica Acta 120, 1966

113 Venge, P., Olsson, J.
Cationic proteins of human granulocytes
VI. Effects on the complement system and mediation of chemotactic activity
J. Imm. 115, 1975, S. 1505 - 1514

114 Vickers, C.F.H.
Existence of reservoir in the stratum corneum
Arch. Dermatol. 88, 1963, S. 20 - 23

115 Wahlberg, J.E.
Percutaneous absorption of sodium chromate (^{31}Cr), cobaltous (^{58}Co) and mercuric (^{203}Hg) chlorides through excised human and guinea pig skin
Acta derm vener. 45, 1965, S. 415 - 426

116 Walsmann, P., Markwardt, F.
Biochem. und pharmakolog. Aspekte des Thrombin-inhibitors Hirudin
Pharmazie 36, Heft 10, 1981, S. 653 - 660

117 Wesener, G.
Zur Diagnose und Therapie der oberflächlichen Thrombophlebitis in der Sprechstunde
Z. für Haut- und Geschlechtskrankheiten, Bd. 22, Heft 2, 1967, S. 61 - 68

118 Williams, K.I.H., Burstein, S.H., Layne, D.S.
Metabolism of dimethyl sulfide, dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone in the rabbit
Arch. Biochem. Biophys. 117, 1966, S. 84 - 87

119 Witten, V.H., Ross, M.S., Oshry, E. and Hyman,A.B.
Studies of thorium X applied to human skin
I. Routes and degree of penetration and sites of deposition of thorium X applied in selected vehicles
J. invest. Derm. 17, 1951, S. 311 - 322

120 Zesch, A., Schaefer, H., Hoffmann, W.D.
Barriere- und Reservoirfunktion der einzelnen Hornschichtlagen der menschlichen Haut für lokal aufgetragene Arzneimittel
Arch. Derm. Forsch. 246, 1973, S. 103 - 107

121 Zettel, G.
Beobachtung über Exhirud-Salbe bei der Behandlung der Akne vulgaris
Der Landarzt, Heft 13, 1967, S. 633

Lebenslauf

3. 7. 54	geboren in Lohhof als zweites Kind von Michael und Maria Nadler, geb. Huber
1960 - 1964	Besuch der Volksschule in Lohhof
1964 - 1973	Besuch des Josef-Hofmiller-Gymnasiums in Freising
1973	Abitur am Josef-Hofmiller-Gymnasium
1974 - 1976	Studium der Chemie in Erlangen und München
1976 - 1978	Tätigkeit als Arzthelferin bei Dr. Eder in Lohhof
1978 - 1983	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Prakt. Jahr	
Okt. 82 - Febr.83	Ausbildung in der HNO-Poliklinik in München-Großhadern
Febr. 83 - Mai 83	Ausbildung in Innerer Medizin im Krankenhaus Neuperlach
Mai 83 - Sept. 83	Ausbildung in Chirurgie in der Krankenanstalt des 3. Ordens in Nymphenburg
Nov. 1983	Ärztliche Prüfung
11. 4. 80	Heirat des Kriminalbeamten Josef Florian Gasteiger
25.10. 83	Geburt einer Tochter
Seit Dez. 1980	Durchführung der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. H. Fritz und Dr. U. Seemüller in der Abt. für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik der Universität München